

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EXPRESSION ET PURIFICATION DE L'HÉLICE TRANSMEMBRANAIRE
S5 DU CANAL POTASSIQUE HERG ET ÉTUDE PAR RMN DU RÔLE DU
SEGMENT EXTRACELLULAIRE ILE⁵⁸³ – TYR⁵⁹⁷ DANS LE SYNDROME
DU LONG QT

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR

ÉTIENNE CHARTRAND

AVRIL 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*«To accomplish great things,
we must not only act,
but also dream,
not only plan,
but also believe»*

-Anatole France

Remerciements

J'aimerais profiter de cette section pour remercier les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire, soit par leur apport scientifique ou personnel.

Tout d'abord, un merci bien spécial à ma directrice de recherche Isabelle Marcotte ainsi qu'à ma co-directrice Sarah Jenna qui m'ont si bien accueilli dans leurs laboratoires. Vous êtes deux femmes formidables et passionnées qui avez su me faire sentir à ma place dès mon arrivé dans votre équipe. Merci pour votre gentillesse et votre encadrement; je vous apprécie et je vous respecte beaucoup.

J'aimerais également souligner la contribution exceptionnelle du Dr. Alexandre Arnold (le manager et spécialiste de la RMN) qui, par sa patience exemplaire et son savoir faire, a su surmonter tous les obstacles reliés aux expériences de RMN. Alex, tu es vraiment quelqu'un de bien et je t'admire beaucoup. Merci pour ton aide.

Je me dois de remercier mes amis et collègues de laboratoire qui, de par leur présence et leur soutien moral ou technique, ont su rendre mon séjour encore plus agréable. Je pense ici à Germain, Richard, J-P, Fred, Slav, Patrick, Andrée, Sharon et Élodie.

Pour terminer, j'aimerais prendre ces dernières lignes afin de souligner la contribution de plusieurs personnes que je porte fièrement dans mon cœur. Tout d'abord, merci à mes amis Simon Chénier-Gauvreau, Alexandre Gougeon-Lalonde et Alexandre Sauvé que je considère comme des frères et qui ont toujours été là pour moi. Merci pour tous les bons moments passés en votre compagnie. Merci pour vos encouragements et votre support moral. Je me considère chanceux de pouvoir compter sur trois bons amis comme vous. Finalement, mes remerciements les plus sincères vont à ma famille. Merci à mes parents (Murielle et Raynald) et ma petite sœur (Andréanne) qui ont toujours cru en moi et qui m'ont toujours encouragé à me surpasser. Merci pour votre soutien moral et financier, pour vos petites attentions à mon égard ainsi que pour votre amour inconditionnel. Je n'aurais jamais réussi sans vous.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iv
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SYMBOLES ET ACRONYMES	xi
LISTE DES UNITÉS	xiii
RÉSUMÉ	xiv

CHAPITRE I

INTRODUCTION	1
1.1 Le syndrome du QT long	1
1.2 Les canaux potassiques hERG	2
1.3 Les médicaments cardiotoxiques	5
1.4 Problématique/Objectif	8
1.5 Membranes modèles	9

CHAPITRE II

ASPECT THÉORIQUE	12
2.1 Théorie générale de la RMN	12
2.1.1 Effet Zeeman	14
2.1.2 Déplacement chimique	15
2.1.3 Couplage scalaire	16
2.1.4 Couplage dipolaire	17
2.1.5 Couplage électrique quadripolaire	18
2.1.6 Rotation à l'angle magique	20
2.2 RMN et étude des systèmes protéines/membranes	20
2.2.1 Problème du temps de corrélation	20
2.2.2 RMN du ^1H pour l'étude des peptides	22
2.2.3 Étude des systèmes membranaires par résonance magnétique nucléaire (RMN)	26
2.3 Étude structurale de peptide/protéines par dichroïsme circulaire	30

CHAPITRE III	
POTENTIAL ROLE OF THE MEMBRANE IN THE HERG CHANNEL FUNCTIONING AND DRUG-INDUCED LONG QT SYNDROME	33
3.1 Abstract	34
3.2 Introduction	34
3.3 Materials and Methods	37
3.3.1 Materials	37
3.3.2 Sample preparation	38
3.3.3 Solution and solid-state NMR	39
3.3.4 Circular dichroism experiments	41
3.4 Results	42
3.4.1 Interaction of I ⁵⁸³ -Y ⁵⁹⁷ with model membranes	42
3.4.2 Interaction of cardiotoxic drugs with I ⁵⁸³ -Y ⁵⁹⁷ and model membranes	55
3.5 Discussion	59
3.6 Conclusions	62
 CHAPITRE IV	
EXPRESSION ET PURIFICATION DU SEGMENT GLY⁵⁴⁶ – LEU⁶⁰² DU CANAL HERG	63
4.1 Introduction	63
4.2 Stratégie	67
4.3 Résultats	73
4.4 Problèmes et solutions	83
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	86
 BIBLIOGRAPHIE	88

Liste des figures

Figure 1.1 : Électrocardiogramme normal comparé à celui d'un patient affecté du SQT...	1
Figure 1.2 : Structure du canal hERG.....	3
Figure 1.3 : Structure du canal hERG avec l'alignement des séquences d'acides aminés correspondant à la fin de l'hélice S5 jusqu'au milieu de l'hélice S6 pour les canaux potassiques KcsA, KvAP, MthK, Shaker et hERG.....	4
Figure 1.4 : Séquence IGWLHNLGDQIGKPY (Ile ⁵⁸³ -Tyr ⁵⁹⁷) du canal hERG.....	8
Figure 1.5 : Organisation moléculaire (A) d'une micelle, (B) d'une vésicule multilamellaire et (C) d'une bicelle.....	10
Figure 1.6 : Structure de différents surfactants et lipides couramment utilisés en RMN.....	11
Figure 2.1 : Relation entre le moment angulaire de spin (\vec{I}) et un champ magnétique externe (B_0).....	12
Figure 2.2 : Différents niveaux d'énergie pour un noyau de spin $\frac{1}{2}$ avec ou sans champ magnétique B_0	15
Figure 2.3 : Nomenclature des protéines.....	17
Figure 2.4 : Schématisation du couplage dipolaire.....	18
Figure 2.5 : Diagramme des niveaux d'énergie d'un noyau de spin 1.....	19
Figure 2.6 : Spectre de RMN du proton pour une protéine insérée dans : A) une micelle isotrope; B) une bicelle de taille moyenne; C) une grande bicelle.....	21
Figure 2.7 : Séquence d'impulsion TOCSY.....	22
Figure 2.8 : Séquence d'impulsion NOESY.....	23
Figure 2.9 : Séquence de l'expérience PFGSE (Pulsed Field Gradient Spin Echo).....	24
Figure 2.10 : Séquence d'impulsion STD.....	25
Figure 2.11 : Structure d'un phospholipide et schématisation de l'information qu'il est possible de recueillir par RMN du ^{31}P et du ^2H	26
Figure 2.12 : Spectre de RMN du phosphore-31 caractéristiques (A) de vésicules multilamellaires et (B) de systèmes bicellaires.....	28

Figure 2.13 : A) Phospholipide deutéré ; B) Spectre RMN en deutérium d'une bicelle constituée de lipides deutérés et éclatement quadripolaire.....	29
Figure 2.14 : Mesure de l'interaction de la lumière polarisée circulairement avec une molécule optiquement active.....	30
Figure 2.15 : Spectres de CD associés à différents types de structures secondaires.....	31
Figure 2.16 : Diagramme du fonctionnement d'un spectropolarimètre.....	32
Figure 3.1 : <i>Amide and aromatic regions of the ^1H NMR spectra of hERG (583-597) in A) water, B) bicelles, C) SDS-d_{25}.....</i>	42
Figure 3.2 : <i>^{31}P (A) and ^2H (B) ssNMR spectra of DMPC/DHPC bicelles ($q=3.5$) (black line) and spectrum of DMPC/DHPC bicelles + hERG peptide (100:1) at 37°C (dashed line).....</i>	47
Figure 3.3 : <i>Quadrupolar splitting (in kHz) versus deuteron position of the DMPC-d_{54} acyl chains for bicelles and bicelles + hERG peptide.....</i>	48
Figure 3.4 : <i>Observed STD on HN protons for selected residues when choline (\circ), glycerol (\blacksquare) or terminal methyl (Δ) lipid resonances are saturated.....</i>	51
Figure 3.5 : <i>Effect of membrane environment on hERG (583-597) peptide structure: CD spectra of hERG peptide in various membrane mimetic environments, surfactant:peptide ratios of (100:1).....</i>	53
Figure 3.6 : <i>$^1\text{H}_\alpha$ secondary chemical shifts of hERG (583-797) in DMPC/DHPC ($q=1$) (black), H_2O (pH=5.5) (grey) and SDS-d_{25} (top).....</i>	55
Figure 3.7 : <i>^{31}P (left) and ^2H (right) ssNMR spectra of DMPC/DHPC bicelles ($q=3.5$) at 37°C in the presence of A) pentamidine, B) diphenhydramine, C) cetirizine and D) bepridil (dotted lines) with a drug to lipid ratio (100:1).....</i>	57
Figure 4.1 : Système d'expression sans cellule comparé au système d'expression <i>E. coli</i>	66
Figure 4.2 : Partie S5 et S6 du canal hERG avec sites de coupures enzymatiques.....	69
Figure 4.3 : Technologie Gateway.....	70
Figure 4.4 : Bille d'agarose couplée à un atome de Nickel servant à la purification de protéine His-tag grâce aux anneaux imidazoles des histidines.....	72
Figure 4.5 : Analyse de la digestion de hERG1apcDNA3 par Xho1 par électrophorèse en gel d'agarose 0,8%.....	73

Figure 4.6 : Image démontrant les résultats de la migration de l'ADN obtenus par PCR sur gel d'agarose 0,8%.....	74
Figure 4.7 : Image démontrant les résultats de la migration de l'ADN obtenu après traitement PEG 30% sur un gel d'agarose 0,8%.....	75
Figure 4.8 : Image démontrant les résultats de la migration de l'ADN du clone d'entrée extrait et purifié des bactéries E. coli DH5 α ayant subi une transformation avec le plasmide pDONR201 recombiné avec le produit PCR S5 sur un gel d'agarose 0,8%.....	76
Figure 4.9 : Image démontrant les résultats du PCR (ayant migré sur gel d'agarose 0,8%) effectué avec une colonie pour chaque transformation afin de confirmer la présence de S5 dans chacun des 6 plasmides transformés.....	77
Figure 4.10 : Image démontrant les résultats de la migration de l'ADN des clones d'expressions extraits et purifiés des bactéries E. coli DH5 α	77
Figure 4.11 : Résultats du dot-blot obtenu pour chacune des trois colonies des six vecteurs testées avec les quatre protocoles.....	79
Figure 4.12 : Résultats du dot-blot #2 pour vérifier la solubilité de la protéine recombinante d'intérêt.....	81
Figure 4.13 : Gel SDS-PAGE 19% démontrant la digestion par Factor Xa.....	82

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Exemple de médicaments « SCTL-actifs ».....	6
Tableau 1.2 : Médicaments cardiotoxiques utilisés dans le projet de recherche...	7
Tableau 2.1 : Abondance naturelle, nombre de spin, rapport gyromagnétique et fréquence de Larmor des noyaux étudiés dans ce travail.....	13
Tableau 3.1 : <i>Translational diffusion coefficients and calculated fraction of bound hERG peptide to bicelles and of cardiotoxic drugs to hERG peptide in water or in the presence of bicelles and to model membranes</i>	45
Tableau 4.1 : Programme ayant servi à l'amplification du segment d'ADN codant pour la partie S5 et S6 du canal hERG.....	68
Tableau 4.2 : Contenu du mélange à PCR utilisé pour amplifier les segments d'ADN d'intérêts.....	68
Tableau 4.3 : Caractéristiques de chacun des six vecteurs de destination utilisés lors de la réaction LR pour la transformation par la méthode Gateway.....	71
Tableau 4.4 : Tableau correspondant aux résultats du dot-blot afin de vérifier l'expression de la protéine recombinante d'intérêt.....	80
Tableau 4.5 : Tableau correspondant aux résultats du dot-blot #2 obtenu pour chacun des puits.....	81

Liste des abréviations, symboles et acronymes

^1H	Proton
^2H	Deutérium
^{31}P	Phosphore-31
a.a.	Acide aminé
ADC/ δ	Anisotropie de déplacement chimique
B_{eff}	Champ magnétique effectif
B_0	Champ magnétique externe
CD	Circular dichroïsm
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMC	Concentration micellaire critique
ΔE	Différence d'énergie
DHPC	Dihexanoylphosphatidylcholine
δ_{iso}	Déplacement chimique isotrope
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DMPS	Dimyristoylphosphatidylsérine
DPC	Dodécylphosphocholine
$\Delta\nu_Q$	Écart quadripolaire
E_d	Énergie de couplage
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
γ	Rapport gyromagnétique (unité = $\text{rad}\cdot\text{T}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
h	Constante de Planck
\hat{H}_δ	Interaction de déplacement chimique
\hat{H}_D	Couplage dipolaire
HEK	Human Embryonic Kidney
hERG	human ether-a-go-go-related-gene
\hat{H}_J	Couplage scalaire
\hat{H}_Q	Interaction quadripolaire
\hat{H}_z	Effet Zeeman
\vec{J}	Moment angulaire de spin
J	Constante de couplage
K^+	Potassium
KcsA	K^+ channel from <i>Streptomyces lividans</i>
Kv	Canaux potassiques voltage-dépendants
KvAP	K^+ channel from <i>Aeropyrum pernix</i>
LMPC	Lysomyristoylphosphatidylcholine

LPC	Lysophosphatidylcholine
LPG	Lysophosphatidylglycerol
MAS	Rotation à l'angle magique (magic angle spinning)
MLV	Multilamellar vesicule
MthK	Methanobacterium thermoautotrophicum K ⁺ channel
MTS	Methanethiosulfonate
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PC	Phosphatidylcholine
PFGSE	Pulsed Field Gradient Spin Echo
PS	Phosphatidylsérine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
σ	Paramètre d'écran chimique
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SQTL	Syndrome du QT Long
STD	Saturation Transfert Difference
TOCSY	TOTAL Correlation Spectroscopy
$\vec{\mu}$	Moment magnétique
ν_0	Fréquence de Larmor

Liste des unités

Å	Unité de mesure (Ångström)
Da	Unité de masse atomique (Dalton)
g/mol	Masse molaire (gramme par mole)
I	Nombre quantique de spin
kDa	Unité de masse atomique (kiloDalton)
T	Unité de force d'un champ magnétique (Tesla)
s	Unité de mesure du temps (seconde)
M	Molaire
ms	Unité de mesure du temps (milliseconde)
ppm	Unité de mesure de déplacement chimique (partie par million)
cm ⁻¹	Unité de fréquence (Nombre d'onde)
nm	Unité de mesure (nanomètre)
mm	Unité de mesure (millimètre)
µm	Unité de mesure (micromètre)
ml	Unité de volume (millilitre)
mg	Unité de masse (milligramme)
N	Unité de force (Newton)

Résumé

Le syndrome du QT long (SQTL) est une anomalie du cœur caractérisée par une prolongation de l'intervalle de repolarisation entre les ondes Q et T sur l'électrocardiogramme. Ce syndrome pouvant provoquer de l'arythmie et même la mort peut être causé par des mutations génétiques, ou par la prise de certains médicaments. Plusieurs médicaments vendus sous ordonnance qui induisaient le syndrome du QT long ont été retirés du marché au cours de la dernière décennie et plusieurs autres ont échoué les tests de contrôle avant même leur sortie en pharmacie. La plupart de ces médicaments provoquent le SQTL à des doses thérapeutiques et dans pratiquement tous les cas, le syndrome est causé par une interaction du médicament avec le canal potassique transmembranaire du *human ether-à-go-go-related-gene* (hERG). Selon plusieurs études, la majorité des molécules qui bloquent le canal hERG se lieraient à des sites localisés dans la partie intracellulaire de la région du pore (hélice transmembranaire S5 et/ou S6) ou dans la région extracellulaire qui connecte S5 et S6. Dans la présente recherche, le rôle du segment extracellulaire (Ile⁵⁸³ – Tyr⁵⁹⁷) dans le fonctionnement du canal hERG et dans le mécanisme du SQTL fut étudié. Pour ce faire, l'interaction de ce segment avec quatre médicaments cardiotoxiques (bépridil, cétirizine, diphenhydramine, pentamidine) fut analysée en plus de vérifier l'interaction de ce segment et des médicaments avec des membranes modèles. Une approche combinant la RMN de l'état liquide et de l'état solide jumelée avec des analyses de dichroïsme circulaire a permis d'obtenir les conclusions suivantes. Tout d'abord, les résultats des interactions peptide-médicaments étudiées par RMN de l'état liquide du ¹H par des mesures de diffusion à l'aide de gradients de champ pulsés suggèrent une faible interaction du peptide avec chacun des médicaments dans un environnement aqueux. Cependant, une très forte interaction des médicaments et du peptide avec la membrane a été observée, suggérant un rôle potentiel de cette dernière dans la cardiotoxicité des médicaments provoquant le SQTL. Ensuite, les résultats des interactions médicaments-membranes et peptide-membrane étudiées par RMN de l'état solide du ²H et du ³¹P suggèrent une importante perturbation de la membrane (tant au niveau des têtes polaires que des chaînes acyle) par le segment extracellulaire Ile⁵⁸³ – Tyr⁵⁹⁷. Finalement, les analyses de dichroïsme circulaire ont permis de démontrer que ce segment n'adopte pas une structure secondaire bien définie malgré sa forte interaction avec la membrane. Cependant, la conformation de ce segment varie en fonction de la nature et de la charge de la membrane modèle, ce qui prouve sa grande flexibilité structurale. Ces résultats suggèrent que la membrane joue un rôle important dans le fonctionnement du canal hERG, probablement en stabilisant des conformations transitoires durant les processus d'ouverture et de fermeture contrôlés par voltage. En terminant, les expériences biochimiques réalisées ont permis d'exprimer avec succès le segment S5. Des expériences sont toujours en cours pour purifier ce segment.

Mots clés: Syndrome du QT long; hERG; médicaments cardiotoxiques; membrane modèle; RMN de l'état liquide; RMN de l'état solide; interaction médicaments-membranes; interaction peptide-membranes

CHAPITRE I

Introduction

1.1 Le syndrome du QT long

Le syndrome du QT long (SQTL) est une anomalie du cœur caractérisée par une prolongation de l'intervalle de repolarisation entre les ondes cardiaques Q et T sur l'électrocardiogramme (Figure 1.1). Ce syndrome pouvant provoquer de l'arythmie et même l'arrêt cardiaque peut être causé par des mutations génétiques ou par la prise de certains médicaments.

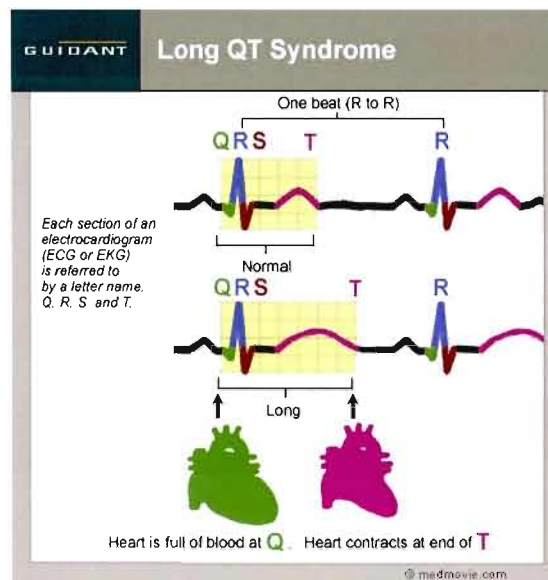


Figure 1.1. Électrocardiogramme normal comparé à celui d'un patient affecté du SQTL. Un battement cardiaque correspond à la section entre R et R. Le cœur est rempli de sang à la section Q tandis qu'il est contracté à la fin de l'onde T [1].

Plusieurs médicaments vendus sous ordonnance qui induisaient le SQTL ont été retirés du marché au cours de la dernière décennie et plusieurs autres ont échoué les tests de contrôle avant même leur mise en marché [2]. Fait inquiétant, les médicaments provoquant le SQTL appartiennent à diverses classes et possèdent

différentes structures. Parmi ceux-ci, on retrouve des antibiotiques, des antihistaminiques, des antipsychotiques, des antiarythmiques [3, 4] et des antiémétiques [5]. La plupart de ces médicaments provoquent le SQTl à des doses thérapeutiques et, dans pratiquement tous les cas, le syndrome est causé par une interaction du médicament avec le canal potassique transmembranaire du *human ether-à-go-go-related-gene* (hERG). Un des grands défis du domaine pharmaceutique consiste donc à développer des molécules actives qui n'interagissent pas (ou très peu) avec les canaux hERG.

Il est estimé que 25-40% de tous les nouveaux médicaments prometteurs présentent un certain degré de toxicité dû à une interaction avec les canaux hERG [6]. Par conséquent, les organismes de réglementation tels que la *Food and Drug Administration* (FDA) et la *European Medicines Agency* (EMA) exigent maintenant des données de tests pré-cliniques en rapport avec l'interaction de ces nouvelles molécules et les canaux du hERG [7]. Pour accélérer et faciliter ces tests pré-cliniques, plusieurs compagnies (telles que GenScript et Millipore) vendent des lignées de cellules stables qui surexpriment les canaux hERG afin de mesurer l'interaction médicament-hERG par électrophysiologie. Deux souches très populaires sont les cellules hERG-HEK (*Human embryonic kidney*) et les cellules hERG-CHO (*Chinese hamster ovary*).

1.2 Les canaux potassiques du hERG

Les canaux à potassium du hERG sont des canaux ioniques voltage-dépendants essentiels au bon fonctionnement de l'activité électrique du cœur. Un canal fonctionnel est composé de quatre sous-unités identiques contenant chacune six hélices transmembranaires S1 à S6 (Figure 1.2). Les quatre premières hélices constituent la région de sensibilité au voltage tandis que le filtre de sélectivité des ions K^+ et la petite hélice du pore (P) se retrouvent dans la partie extracellulaire entre les hélices S5 et S6.

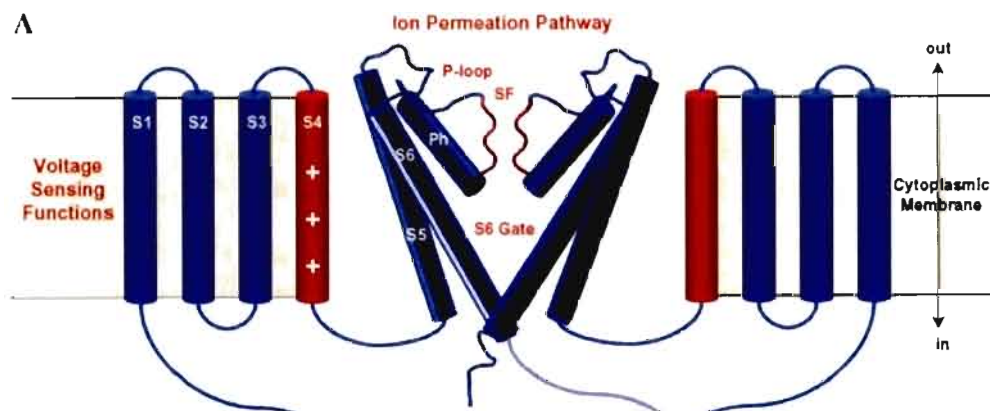


Figure 1.2. Structure du canal hERG [8]

L'hélice S4 contient six charges positives, ce qui est typique des canaux à potassium dont l'ouverture et la fermeture sont contrôlés par voltage. De l'hélice S5 jusqu'à l'hélice S6 en incluant l'hélice du pore se trouve la région qui constitue le pore du canal. On croit que les médicaments cardiotoxiques viennent principalement s'ancrer dans cette région [8-12]. Elle représente donc la partie d'intérêt pour l'étude par RMN des sites d'interactions entre le canal du hERG et les médicaments « SQT-actifs ».

De nombreux indices suggèrent qu'il existe plusieurs différences importantes dans la taille et la structure de la cavité interne du canal du hERG en comparaison avec d'autres canaux potassiques voltage-dépendants (Kv). En effet, le blocage causé par des aminopyridines, des ions Ba^{2+} et par de petites molécules amines quaternaires chargées fut démontré pour différents canaux Kv [13]. Cependant, ces molécules sont relativement petites comparativement à celles pouvant bloquer le canal du hERG. Cette observation laisse donc croire que la cavité interne du canal du hERG est plus large que celles des autres canaux Kv. De plus, des études d'homologie réalisées grâce aux structures cristallographiques des canaux KcsA (*K⁺ channel from Streptomyces lividans*) et MthK (*Methanobacterium Thermoautotrophicum K⁺ channel*) ainsi que des études de mutagenèse dirigée ont permis de démontrer que la cavité interne du hERG est composée de résidus aromatiques et polaires qui permettent des interactions hydrophobes et électrostatiques avec une grande variété de molécules [13]. En observant la figure 1.3, il est possible de constater que le « S5-P linker » du hERG est beaucoup plus long que celui des autres canaux présentés (40 a.a pour le hERG et 10-15 a.a. pour

les autres canaux). De plus, la région Ile⁵⁸³-Tyr⁵⁹⁷ présentée en encadré est une région composée de quinze acides aminés consécutifs ayant un impact fort (orange) ou intermédiaire (bleu) sur le bon fonctionnement du canal. Les résidus à impact fort, lorsque substitués par une cystéine, perturbent sévèrement le fonctionnement du canal du hERG. Au contraire, cette substitution pour les résidus à impact intermédiaire est bien tolérée sauf lorsqu'une modification subséquente au niveau des thiols des chaînes latérales est effectuée par des agents methanethiosulfonate (MTS). Après cette modification, l'activité du canal est soit supprimée ou grandement perturbée [14]. Dans la séquence primaire, la région Ile⁵⁸³-Tyr⁵⁹⁷ se trouve loin de l'entrée du pore. Cependant, tel que mentionné précédemment, leurs mutations affectent grandement le processus d'inactivation ainsi que la sélectivité pour les ions K⁺, ce qui laisse croire que ce segment se trouverait près du pore et du filtre de sélectivité dans la structure tertiaire.

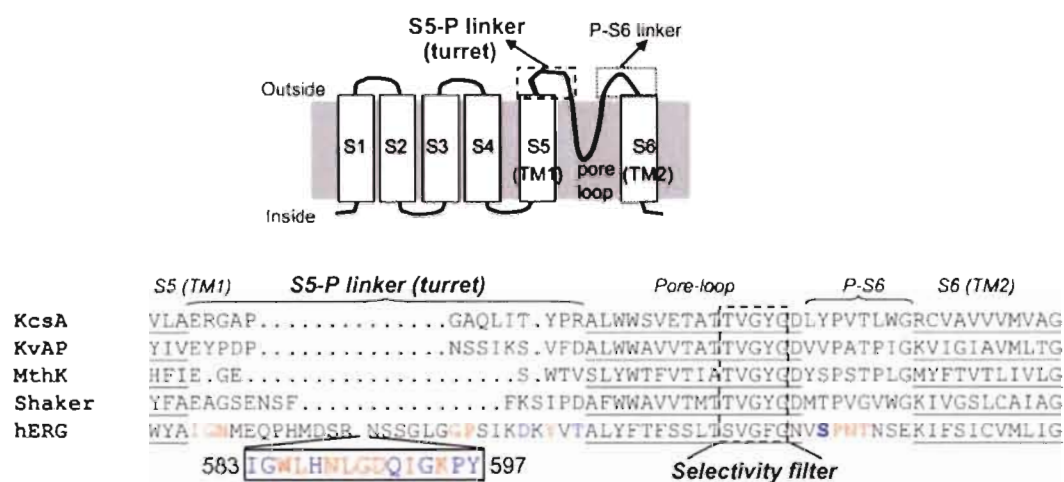


Figure 1.3. Structure du canal hERG avec l'alignement des séquences d'acides aminés correspondant à la fin de l'hélice S5 jusqu'au milieu de l'hélice S6 pour les canaux potassiques KcsA, KvAP, MthK, Shaker et hERG. Le segment Ile⁵⁸³-Tyr⁵⁹⁷ du hERG est présenté dans l'encadré noir. La séquence signature correspondant au filtre de sélectivité des canaux K⁺ est présentée dans l'encadré pointillé [8].

Les hélices de la cavité interne des canaux potassiques possèdent un certain nombre de résidus glycine ou proline qui agissent comme points faibles dans les hélices- α et permettraient la flexibilité nécessaire au mouvement de ces hélices

internes durant le processus d'activation. Les canaux Kv et hERG possèdent une glycine (G648 sur l'hélice S6 chez hERG) à la position correspondante au point de pivot lors du processus d'activation/inactivation des canaux MthK et KvAP (*K⁺ channel from *Aeropyrum Pernix**) [15, 16]. Ils possèdent également un second site pivot situé plus bas le long de l'hélice interne (G657 sur l'hélice S6 chez hERG). Pour les canaux Kv, ce site est un motif conservé Pro-X-Pro qui agit comme jonction flexible nécessaire au processus d'activation/inactivation [17]. On sait que ce motif Pro-X-Pro limiterait la taille de la cavité interne des canaux Kv. Chez le canal du hERG, la seconde proline est remplacée par une glycine. À ce jour, on n'a toujours pas déterminé si ces deux points flexibles sont nécessaires au processus normal d'activation du canal du hERG et des canaux Kv. On sait cependant que la longueur, le volume et le positionnement des résidus constituant les hélices de la cavité interne des canaux potassiques jouent un rôle critique dans le processus de blocage par des médicaments cardiotoxiques.

1.3 Les médicaments cardiotoxiques

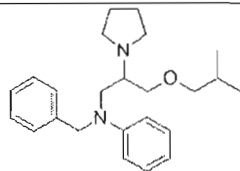
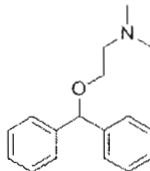
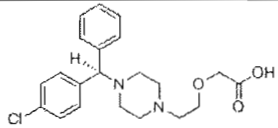
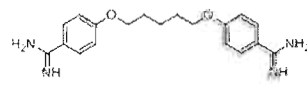
La majorité des molécules qui bloquent le canal du hERG exerceraient leur activité en se liant sur des sites situés dans la partie intracellulaire de la région du pore (segment S5 et/ou S6). Ces hypothèses se basent sur des études d'électrophysiologie réalisées avec des inhibiteurs potentiels sur des formes mutantes du canal hERG et sur des études de cristallographie réalisées avec des canaux potassiques bactériens (KcsA et MthK) à l'état ouvert et fermé (Sanguinetti et coll. 2006). Tel que mentionné précédemment, la structure du canal du hERG présente des différences avec ces canaux. Il est donc important de vérifier ces hypothèses sur le canal hERG. La liste suivante présente des exemples de médicaments avec leur classe pharmacologique ayant le potentiel d'induire le SQT.

Tableau 1.1. Exemples de médicaments « SCTL-actifs » [8].

Classe pharmacologique	Exemples de médicaments
Prokinétiques gastro-intestinaux	cisapride, domperidone
Antiémétiques	dolasetron, granisetron, ondansetron
Médicaments cardiovasculaires	amiodarone, sotalol, quinidine, dofetilide, bepridil, diltiazem, indapamide, isoproterenol, ketanserin, mibefradil,
Antibactériens	clarithromycin, erythromycin, gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, roxithromycin, sparfloxacin
Antifongiques	fluconazole
Anesthésiant	enflurane, fentanyl, halothane, isoflurane, pentobarbital, sevoflurane, sufentanyl, thiopental
Opiïdes	levacetylmethadol, methadone
Antipsychotiques	amisulpride, chlorpromazine, clozapine, droperidol, haloperidol, olanzapine, pimozide, quetiapine, risperidone, sertindole, thioridazine, ziprasidone
Antidépresseurs	amitriptyline, citalopram, desipramine, doxepin, fluoxetine, imipramine, nortriptyline, paroxetine
Antimalariques	chloroquine, halofantrine, mefloquine, quinine
Antiasthmatiques	fenoterol, procaterol, salbutamol, salmeterol, terbutaline
Antihistaminiques	astemizole, cetirizine, diphenhydramine, terfenadine
Autres	arsenic trioxide, pentamidine, tacrolimus

Le tableau 1.2 présente les quatre médicaments étudiés dans le présent projet. Ces médicaments ont été choisis en fonction de la diversité au niveau de leur structure chimique, de leurs classes pharmacologiques variées, de leur solubilité dans l'eau (très soluble à peu soluble) et de leur caractère hydrophile/hydrophobe (logP).

Tableau 1.2 : Médicaments cardiotoxiques utilisés dans le projet de recherche

Médicaments cardiotoxiques [18]	Poids moléculaire	Solubilité	LogP	Structure
Bepidil Bloqueur de canaux calciques utilisé pour traiter l'angine	403 g/mol	Peu soluble	5,33	
Diphenhydramine Benadryl TM (antihistamine) Unisom TM (sommifère)	291,82 g/mol	1000 mg/L	3,44	
Cetirizine Reactine TM (antihistamine)	461,81 g/mol	101 mg/L	2,98	
Pentamidine (médicament antimicrobien utilisé pour traiter certaines pneumonies)	592,68 g/mol	Très soluble	1,32	

Le logP est une mesure de la solubilité différentielle de composés chimiques dans deux solvants (coefficient de partage octanol/eau). Il est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau [18].

$$\text{LogP} = \text{Log}(C_{\text{oct}}/C_{\text{eau}}).$$

1.5 Membranes modèles

Les membranes biologiques sont des bicouches fluides contenant un mélange de lipides, protéines et sucres. Leur composition complexe les rend donc difficilement étudiables par résonance magnétique nucléaire (RMN). Pour remédier à ce problème, on utilise des membranes lipidiques modèles de composition et structure similaires à celles des biomembranes. Plusieurs systèmes lipidiques peuvent être utilisés tout dépendamment de l'information recherchée (structure, interactions, etc.) et du type de RMN utilisée (état liquide ou solide). Cet aspect sera discuté plus en détail dans le chapitre 2. Parmi ces systèmes, on retrouve les micelles, les vésicules multilamellaires ainsi que les bicelles (figure 1.5).

Une micelle est constituée d'un agrégat de surfactants, tels que des détergents, de petits phospholipides ou des phospholipides à une chaîne. Ces molécules possèdent une tête polaire hydrophile et une queue hydrophobe. À titre d'exemple, le dodécylsulfate de sodium (sodium dodecylsulfate, SDS) ou la dodécylphosphocholine (DPC) (figure 1.6) forment des micelles lorsque leur concentration est supérieure à la concentration micellaire critique (CMC). Le SDS est un surfactant très anionique avec une CMC de 8mM et son agrégation pour former des micelles est affectée par la concentration de sel présent dans l'environnement et par la température. Le DPC, quant à lui, est un phospholipide à une chaîne acyle avec une tête zwitterionique, et possède une CMC de 1,1mM et son agrégation n'est pas affectée par la concentration de sel [19]. La micelle adopte une forme sphérique tel que représenté par la figure 1.5A, de taille plus petite comparativement aux bicelles ou aux vésicules multilamellaires. Les micelles sont uniquement utilisées pour la RMN de l'état liquide.

On retrouve également d'autres types d'assemblages lipidiques conçus pour imiter le milieu natif des protéines membranaires telles que les vésicules multilamellaires (*multilamellar vesicle*, MLV). Ces MLV sont constituées de plusieurs bicouches de phospholipides (figure 1.5B). Ces types d'assemblages

sont les plus recherchés car ils imitent le mieux l'environnement natif des protéines membranaires compte tenu de leur bicouche. Cependant, étant donné que les mouvements de ces vésicules sont considérés comme lents du point de vue de la RMN en solution, elles ne conviennent pas pour des études structurales de protéines membranaires avec cette technique. Elles sont plutôt employées en RMN de l'état solide comme il en sera discuté au chapitre 2.

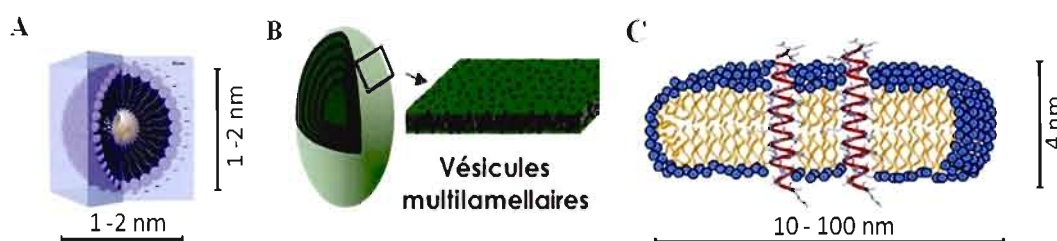


Figure 1.5. Organisation moléculaire (A) d'une micelle, (B) d'une vésicule multilamellaire et (C) d'une bicelle dans laquelle sont incorporées deux polypeptides transmembranaires représentés en rouge

Les bicelles sont des bicouches de forme discoïde qui s'auto-assemblent à partir d'un mélange de phospholipides à longues chaînes (ex. dimyristoylphosphatidylcholine, DMPC) et de phospholipides à courtes chaînes (ex. dihexanoylphosphatidylcholine, DHPC) [20, 21]. Une fois mélangés en milieu aqueux, les lipides à longues chaînes vont constituer la partie plane de la bicouche lipidique tandis que les lipides à courtes chaînes vont stabiliser les côtés de cette même bicouche (figure 1.5C). La taille, la morphologie et les propriétés relatives à l'orientation de la bicelle dans un champ magnétique peuvent être contrôlées en modifiant le rapport molaire (q) des lipides à chaînes longues et à chaînes courtes, en modifiant le pourcentage d'hydratation ou la température. Les petites bicelles qui ne peuvent pas s'orienter dans le champ magnétique sont appelées bicelles isotropes et leur diamètre fut estimé à 80-100 Å [22]. Ces dernières se réorientent très rapidement en solution et sont utilisées en RMN de l'état liquide. Les bicelles de plus grande taille peuvent s'orienter dans le champ magnétique en raison de la

susceptibilité diamagnétique des phospholipides [21]. Cette propriété les rend donc très utiles pour la RMN de l'état solide (voir chapitre 2).

Les structures de différents surfactants et lipides couramment utilisés en RMN afin d'imiter l'environnement lipidique dans lequel se trouvent les protéines membranaires sont présentées à la figure 1.6. Ces molécules amphiphiles avec une ou deux longues ou courtes chaînes de carbones et une tête polaire zwitterionique ou chargée peuvent s'auto-assembler pour former des micelles, des bicelles, des bicouches ou des vésicules multilamellaires.

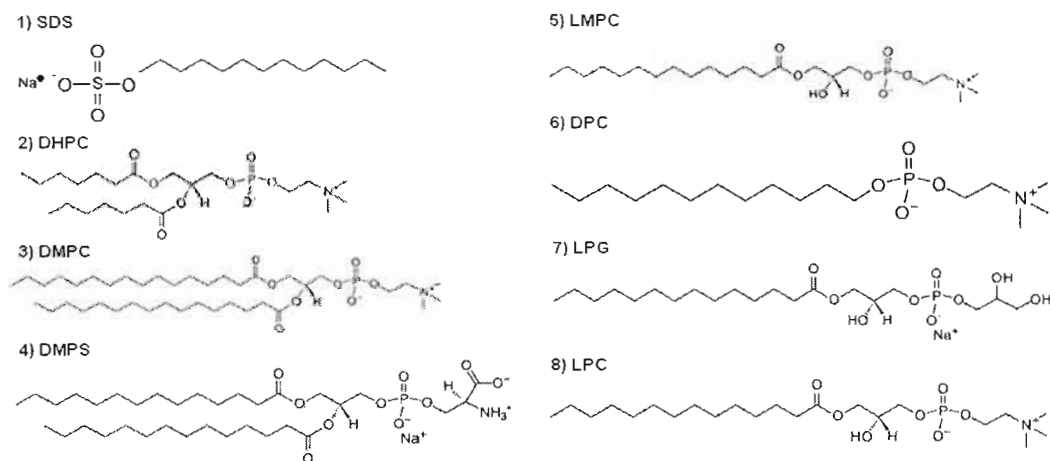


Figure 1.6. Structure de différents surfactants et lipides couramment utilisés en RMN. 1) dodécylsulfate de sodium (SDS); 2) dihexanoylphosphatidylcholine (DHPC); 3) dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC); 4) dimyristoylphosphatidylserine (DMPS); 5) lysomyristoylphosphatidylcholine (LMPC); 6) dodecylphosphocholine (DPC); 7) lysophosphatidylglycerol (LPG); 8) lysophosphatidylcholine (LPC).

Le chapitre suivant explique la théorie nécessaire à la compréhension des résultats. Les principes de bases de la résonance magnétique nucléaire seront présentés mais plus particulièrement ceux en lien avec l'étude des systèmes protéines/membranes. La technique de dichroïsme circulaire ainsi que son utilisation pour l'étude structurale de peptides/protéines sera également présentée.

CHAPITRE II

Aspect théorique

Dans la présente section, un rappel des principes de bases de la résonance magnétique nucléaire et du dichroïsme circulaire seront présentés. Seulement les éléments nécessaires à la compréhension des résultats seront détaillés dans ce chapitre.

2.1 Théorie générale de la RMN

La RMN est une technique d'analyse chimique et structurale non destructive souvent utilisée dans le domaine de la chimie et de la biochimie. Cette technique spectroscopique est applicable aux noyaux possédant un spin I non nul. Le spin nucléaire (ou le moment angulaire de spin \vec{I}) peut être représenté comme un vecteur qui pointe dans la direction de l'axe autour duquel il tourne. Le mouvement de rotation du moment angulaire autour de l'axe z qui définit la direction du champ magnétique est appelé mouvement de précession (figure 2.1).

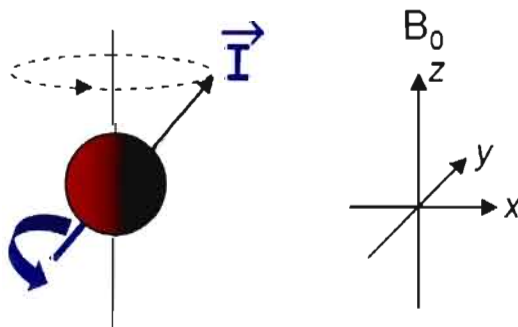


Figure 2.1 : Relation entre le moment angulaire de spin (\vec{I}) et un champ magnétique externe (B_0) [23].

Tous les noyaux de spin non nul possèdent un moment magnétique $\vec{\mu}$ qui est relié au moment angulaire de spin par le rapport gyromagnétique γ , propre à chaque noyau.

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{I} \quad (2.1)$$

où $\hbar = h/2\pi$ et h est la constante de Planck. Le tableau 2.1 présente le nombre de spin, le rapport gyromagnétique et l'abondance naturelle des noyaux étudiés dans ce projet.

Tableau 2.1 : Abondance naturelle, nombre de spin, rapport gyromagnétique et fréquence de Larmor des noyaux étudiés dans ce travail [24].

Noyau	Spin	Abondance naturelle (%)	Rapport gyromagnétique γ (rad·T ⁻¹ ·s ⁻¹)	Fréquence de Larmor ν_0 (MHz) pour $B_0 = 14.1$ T
¹ H	½	99.985	26.75	600.0
² H	1	0.015	4.11	92.2
³¹ P	½	100	10.83	243.3

La fréquence de Larmor ν_0 ($\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$) correspond à la fréquence du mouvement de précession du moment angulaire de spin. Elle dépend seulement du rapport gyromagnétique et du champ magnétique. Puisque le rapport gyromagnétique γ est propre à chaque noyau, cette fréquence sera différente en fonction de la valeur du rapport gyromagnétique pour un champ magnétique donné.

Les interactions subies par les spins dans le champ magnétique sont décrites par les Hamiltoniens :

$$\hat{H}_{total} = \hat{H}_Z + \hat{H}_\delta + \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_Q \quad (2.2)$$

où

\hat{H}_Z correspond à l'effet Zeeman, \hat{H}_δ à l'interaction de déplacement chimique, \hat{H}_J au couplage scalaire, \hat{H}_D au couplage dipolaire, \hat{H}_Q à l'interaction quadripolaire.

Ces différentes interactions seront présentées en détail dans les prochains paragraphes et comme il sera possible de le constater, certaines interactions telles que \hat{H}_d , \hat{H}_D , et \hat{H}_Q dépendent de l'orientation et pourront être négligées selon le milieu étudié. Par exemple, en milieu isotrope (RMN de l'état liquide), les interactions dépendantes de l'orientation sont moyennées en raison du mouvement rapide des molécules dans l'échantillon. Ce n'est pas le cas pour un milieu anisotrope (RMN de l'état solide) où les mouvements moléculaires sont limités et où les molécules peuvent privilégier certaines orientations.

2.1.1 Effet Zeeman (\hat{H}_z)

D'après la mécanique quantique, le moment angulaire d'un noyau de spin I possède $2I+1$ états de spins possibles. En l'absence d'un champ magnétique, chaque état de spin du noyau possèdera la même énergie. Cependant, la présence d'un champ magnétique B_0 aura pour conséquence d'engendrer l'effet Zeeman, i.e. de lever la dégénérescence entre les niveaux d'énergie. La différence d'énergie qui sépare les états de spin (ΔE) est représentée par l'équation 2.3 :

$$\Delta E = h\nu = \gamma\hbar B_0 \quad (2.3)$$

où

$$\nu = \frac{\gamma B}{2\pi} \quad (2.4)$$

ν correspond à la fréquence de radiation magnétique et B à la force du champ magnétique [25].

Plus le champ magnétique ou le rapport gyromagnétique du noyau sont élevés, plus ΔE sera grand et donc meilleure sera la sensibilité (augmentation du signal). Le signal observé en RMN dépend de la différence de population de spins entre les niveaux d'énergie, et l'équation 2.3 démontre la faisabilité d'induire des transitions entre les niveaux d'énergie adjacents grâce à la radiation électromagnétique. La levée de la dégénérescence des niveaux d'énergie d'un

noyau possédant un spin $1/2$ lorsqu'exposé à un champ magnétique externe est présentée à la figure 2.2.

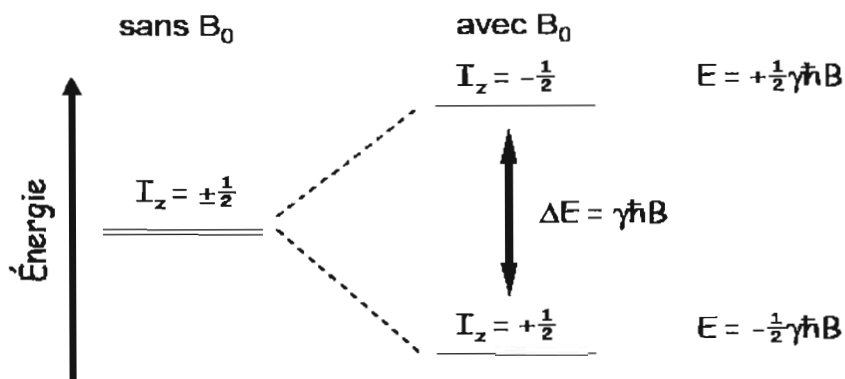


Figure 2.2 : Différents niveaux d'énergie pour un noyau de spin $1/2$ avec ou sans champ magnétique B_0 [23].

2.1.2 Déplacement chimique (\hat{H}_δ)

La fréquence de résonance spécifique d'un noyau au sein d'une molécule dépend de son environnement. En effet, le champ magnétique au niveau du noyau sera différent du champ externe B_0 en raison des perturbations induites par la présence de champs magnétiques locaux créés par les électrons avoisinants. Cet effet d'écran (aussi appelé blindage) produit par la présence de ce nuage électronique aura comme conséquence de diminuer l'effet du champ magnétique externe au niveau du noyau ce qui lui confèrera une fréquence de résonance spécifique dite « effective ».

$$\nu_{\text{eff}} = (1-\sigma) \frac{\gamma}{2\pi} B_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_{\text{eff}} \quad (2.5)$$

où σ est le paramètre d'écran chimique et B_{eff} est le champ magnétique effectif perçu par un noyau blindé par le nuage électronique qui l'entoure [25].

Dans le cas des systèmes anisotropes, le paramètre d'écran chimique dépend de l'orientation du noyau dans le champ magnétique. On parlera alors

d'anisotropie de déplacement chimique (ADC). Le fait que la densité du nuage électronique ne soit pas identique dans toutes les directions autour du noyau implique que l'orientation de la molécule par rapport au champ magnétique influencera la fréquence effective de ce même noyau. L'anisotropie de déplacement chimique est reliée au spectre par :

$$\Delta\nu(\theta) = \frac{2}{3} \Delta\sigma \frac{(3\cos^2\theta - 1)}{2} \quad (2.6)$$

où la fréquence $\nu(\theta)$, exprimée en Hertz, dépend de l'orientation θ du noyau dans le champ magnétique [25].

2.1.3 Couplage scalaire (\hat{H}_J)

Le couplage scalaire provient de l'interaction entre le moment magnétique des spins à travers les liaisons pour des noyaux voisins. Il peut être hétéronucléaire (entre noyaux différents) ou homonucléaire (ex. : entre deux protons). Le couplage d'un noyau avec ses voisins aura pour effet l'apparition de pics multiples (multiplets). La constante de couplage J séparant les pics d'un multiplet donne de l'information sur la position des noyaux donnant lieu au couplage. Le couplage spin-spin le plus utile est celui impliquant des noyaux séparés par trois liaisons (ex. : 3J dans H-C-C-H). Théoriquement et expérimentalement, ces constantes de couplage varient avec l'angle dièdre θ entre les deux plans H-C-C, en fonction de la relation de Karplus pour des protons vicinaux :

$$^3J = A + B \cos\theta + C \cos^2\theta \quad (2.7)$$

où A, B et C sont des constantes de couplages [26].

Cette relation est importante dans la détermination de la conformation de molécules, en particulier l'analyse structurale de protéines. Dans une chaîne polypeptidique (figure 2.3), le couplage entre le ^1H du groupement amide et celui lié au $\text{C}\alpha$ fournit de l'information sur la conformation du squelette de la protéine via l'angle θ . Cet angle dièdre (ϕ ou φ) possède des valeurs spécifiques propres à la

structure secondaire des protéines. Par exemple, les hélices- α et les feuillets- β ont des valeurs caractéristiques de 120° et 180° pour l'angle ϕ , respectivement. L'angle ψ (psi) correspond à l'angle de torsion entre la liaison $C\alpha-C$ tandis que l'angle ϕ (phi) correspond à l'angle de torsion autour de la liaison $N-C\alpha$ [25].

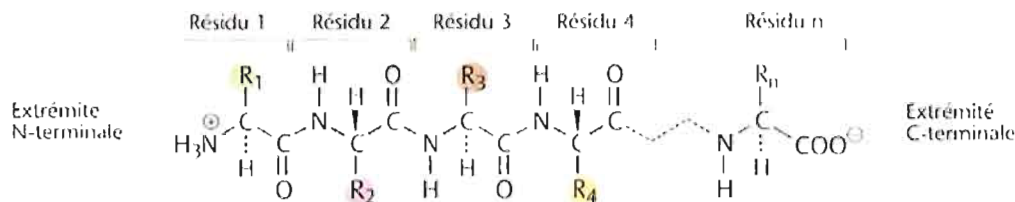


Figure 2.3 : Nomenclature des protéines. Les protéines sont composées d'acides aminés reliés entre eux dans une séquence donnée par des liaisons amides aussi appelées liens peptidiques [27].

Lorsqu'on étudie une protéine par RMN du ^1H , une première étape consiste à attribuer les résonances (établir une corrélation entre les signaux du spectre et les noyaux de la molécule). On exploite le couplage scalaire pour attribuer ces résonances (ex. : expérience COSY ou TOCSY qui sera détaillée plus loin dans ce chapitre).

2.1.4 Couplage dipolaire (\hat{H}_D)

Le couplage dipolaire (figure 2.4) provient de l'interaction directe entre deux dipôles magnétiques à travers l'espace et il est possible de le mesurer. En effet, la grandeur de ces interactions est proportionnelle au rapport gyromagnétique des deux spins et à l'orientation du vecteur internucléaire, et inversement proportionnelle au cube de la distance qui (r) les sépare. L'énergie de ce couplage (E_d) dépend de la distance internucléaire et de l'orientation relative de ces deux noyaux par rapport à la direction du champ magnétique (angle θ) [25] :

$$E_d = \frac{\mu^2}{r^3} (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (2.8)$$

Cette interaction entre le spin d'un noyau et un spin voisin provoquera un éclatement dipolaire observable sur le spectre de RMN par une division des pics. Bien que les

couplages dipolaires contiennent beaucoup d'information structurale, dans une solution isotrope (RMN de l'état liquide), ils sont moyennés à zéro en raison de la diffusion rotationnelle.

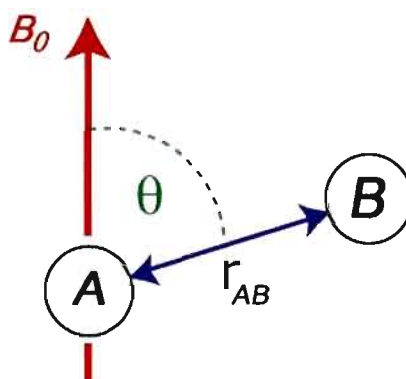


Figure 2.4 : Schématisation du couplage dipolaire.

Des expériences exploitent le couplage dipolaire pour déterminer les distances entre les spins nucléaires (expérience NOESY). Ces contraintes de distances qui vont restreindre la position d'un site moléculaire par rapport à un autre vont permettre la détermination de la structure secondaire de la protéine d'intérêt.

2.1.5 Couplage électrique quadripolaire (\hat{H}_Q)

L'interaction électrique quadripolaire correspond à l'interaction entre le moment électrique du noyau causé par une distribution non uniforme des charges et les gradients de champ électrique au noyau. Cependant, cet effet n'est présent que si le spin est supérieur ou égal à 1. L'interaction du quadripôle électrique avec le gradient de champ électrique des liens électroniques environnants a pour effet de modifier les niveaux d'énergie magnétique. La figure 2.5 montre l'effet du quadripôle électrique sur la levée de la dégénérescence des transitions d'un noyau quadripolaire exposé à un champ magnétique externe.

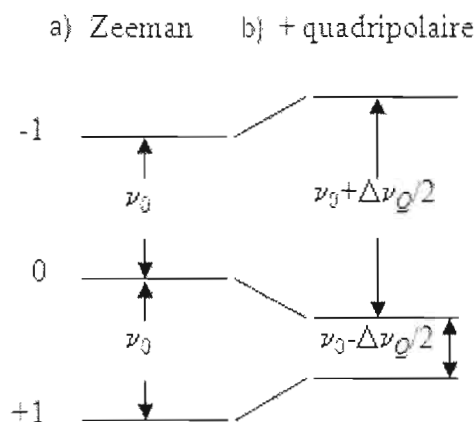


Figure 2.5 : Diagramme des niveaux d'énergie d'un noyau de spin 1. (a) Effet Zeeman et (b) effet Zeeman plus effet du couplage quadripolaire lors de l'exposition à un champ magnétique externe. Tiré et modifié de [23].

Tel que démontré à la figure 2.5 b), l'écart d'énergie entre les trois états de spin ($1 \rightarrow 0$ & $0 \rightarrow -1$) n'est pas le même. Ainsi, on observe l'apparition d'un doublet sur le spectre de RMN. La distance entre les doublets, $\Delta\nu_Q$, est appelée « écart quadripolaire » et est donné par :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3e^2qQ}{4h} (3\cos^2\theta - 1) \quad (2.9)$$

où e^2qQ/h est la constante de couplage quadripolaire et θ est l'angle qui définit l'orientation de l'axe principal du tenseur de gradient de champ électrique par rapport au champ magnétique appliqué. De façon générale, l'amplitude pour $\Delta\nu_Q$ est de l'ordre du kHz [28].

En RMN de l'état solide, les interactions quadripolaires peuvent être utilisées pour obtenir de l'information sur l'orientation et la dynamique d'une protéine membranaire étudiée. De plus, comme il le sera présenté dans la section 2.2.3, il est également possible d'élucider les mécanismes d'interaction d'une molécule avec un système membranaire modèle, notamment grâce à la RMN du ^2H .

2.1.6 Rotation à l'angle magique

En RMN de l'état solide, il est possible d'annuler l'effet de la dépendance orientationnelle ($3\cos^2\theta-1$) des interactions dipolaires, quadripolaires et de déplacement chimiques. Il suffit simplement d'effectuer une rotation rapide (à des vitesses de l'ordre de la dizaine de kHz) de l'échantillon à un angle de 54.7° (voir équation 2.6, 2.8 et 2.9). Cette technique est appelée rotation à l'angle magique ou MAS (*Magic Angle Spinning*). La position de la raie obtenue correspondra au déplacement chimique isotrope (δ_{iso}) et fournira de l'information sur l'environnement chimique du noyau.

2.2 RMN et étude des systèmes protéines/membranes

2.2.1 Problème du temps de corrélation

Le temps de corrélation rotationnel d'un polypeptide dans un échantillon représente la considération principale en spectroscopie de RMN. On peut définir le temps de corrélation comme étant le temps nécessaire à une molécule pour effectuer une rotation de 1 radian ou pour se déplacer sur une distance correspondant à sa propre taille. Ce paramètre est essentiel et sera déterminant dans le choix des conditions d'analyses et de la méthode expérimentale. La réorientation lente est la principale raison pour laquelle il est difficile, voire impossible d'obtenir un spectre de haute résolution en RMN de l'état liquide pour une protéine trop grosse, agrégée ou incorporée dans un assemblage supramoléculaire telle qu'une grosse bicelle. La figure 2.6 illustre bien cette situation où l'on peut observer la différence de signal entre une protéine insérée dans des bicelles de taille moyenne (figure 2.6B) ou larges (figure 2.6C) en comparaison avec cette même protéine dans des micelles (figure 2.6A).

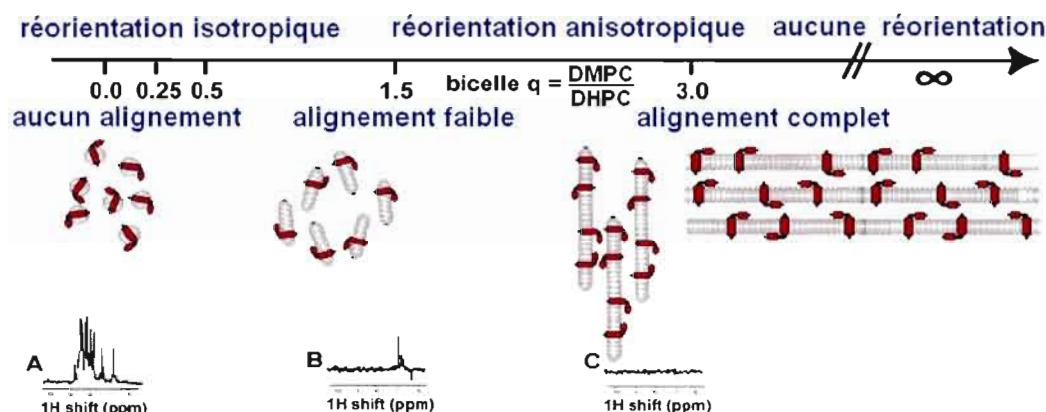


Figure 2.6 : Spectres de RMN de l'état liquide du proton pour une protéine insérée dans : **A)** une micelle isotrope; **B)** une bicelle de taille moyenne; **C)** une grande bicelle. (Image modifiée à partir de [29]).

En ce qui concerne les protéines membranaires, deux options existent pour traiter le problème du temps de corrélation. La première consiste à appliquer la technique de RMN en solution à des protéines membranaires plus petites intégrées dans des micelles ou de petites bicelles et qui se réorientent assez rapidement pour donner un spectre bien résolu. À ce jour, la RMN en solution peut permettre la détermination de complexes protéines/lipides ayant une masse moléculaire d'un maximum de 100 kDa [30]. Cependant, l'obtention de structures bien résolues pour des complexes de haut poids moléculaire est assez rare avec cette technique.

Tel que mentionné précédemment, les protéines membranaires sont difficiles à cristalliser et peuvent former des agrégats lorsqu'on les retire de leur environnement naturel. Pour remédier à ce problème, il est possible d'utiliser la RMN de l'état solide pour l'étude des protéines membranaires incorporées dans des bicouches lipidiques ou dans de larges bicelles qui vont immobiliser les protéines dans leur environnement. Cette technique réussit à contourner les difficultés liées à la cristallisation de protéines membranaires en plus de contourner la limitation concernant la taille du complexe protéines/micelles présent en RMN en solution. En fait, la technique de RMN à l'état solide ne possède en principe aucune limite en lien avec la taille de la protéine et du complexe qu'elle forme avec les lipides.

2.2.2 RMN du ^1H pour l'étude des peptides

2.2.2.1 TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*)

La TOCSY est l'une des expériences de RMN bidimensionnelle qui a été mise au point afin d'identifier des systèmes de spins reliés par le couplage scalaire jusqu'à 4 liaisons. Elle est également connue sous le nom de HOHAHA (HOmonuclear Hartmann-Hahn) [31]. Sa séquence est représentée à la figure 2.7.

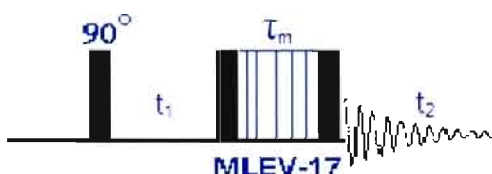


Figure 2.7 : Séquence d'impulsion TOCSY.

Suite à la période d'évolution t_1 , un verrouillage de spins (*spin lock*) est effectué grâce au schéma d'impulsion MLEV-17 (séquence d'impulsions composites recommandée pour les expériences TOCSY) [32]. Ce verrouillage consiste en un champ de radio-fréquence qui verrouille la magnétisation dans le plan xy. Lors de ce verrouillage, les spins percevront seulement le champ de *spin-lock* B_1 et les différences de déplacement chimique deviendront négligeables. Dans ce mode particulier, le transfert de cohérence est possible entre tous les noyaux J couplés dans le système et ce, même s'ils ne sont pas directement couplés. En ajustant la période de verrouillage (τ_m) à un temps de mélange court (20-50 ms), il sera possible d'observer les protons fortement couplés tandis qu'avec un temps de mélange long (100-300 ms), le couplage scalaire avec les protons plus éloignés pourront être mesurés [32]. Ces couplages pourront être observés sur un spectre à deux dimensions (obtenu par double transformée de Fourier) par des pics croisés entre les spins couplés.

2.2.2.2 NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*)

Tel que démontré précédemment, les noyaux peuvent être reliés via les liaisons, mais ils peuvent également interagir à travers l'espace par couplage dipolaire. Dans ce dernier cas, la perturbation des populations de spins à l'état fondamental produira des changements d'intensité dans les signaux de résonance couplés dipolairement sous l'effet NOE (*Nuclear Overhauser Effect*). Cet effet correspond à un transfert de magnétisation à travers l'espace entre des spins suffisamment rapprochés (environ 5 Å pour les ^1H). Sur un spectre à deux dimensions, cet effet s'observera par des pics croisés entre les spins couplés [33]. Voici la séquence de l'expérience NOESY :

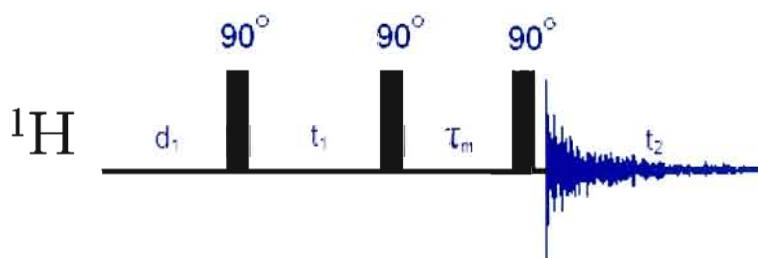


Figure 2.8 : Séquence d'impulsion NOESY [32]. La première impulsion sert à préparer la magnétisation en la faisant basculer de l'axe z vers le plan xy. Le délai t_1 sera d'une durée variée pour donner l'information de déplacement chimique dans la dimension indirecte. La seconde impulsion renvoie la magnétisation selon l'axe z. Lors du temps de mélange τ_m , il y aura mélange de la magnétisation des spins couplés spatialement. Cet effet est appelé « relaxation croisée » et permet la corrélation des déplacements chimiques entre ces spins couplés. La dernière impulsion ramène la magnétisation dans le plan xy pour la détection du signal.

2.2.2.3 Gradients de champ et mesure d'association

Un gradient de champ peut être défini comme un champ magnétique variant de façon linéaire en fonction de la position dans l'échantillon. Ces gradients sont appliqués dans une séquence comme des impulsions et c'est pour cette raison qu'on les nomme gradients de champ pulsés (*pulsed field gradients* ou PFG). Ces

derniers créent une inhomogénéité temporaire du champ magnétique en plus de déphaser la magnétisation transverse dans l'échantillon. La figure 2.9 présente une séquence de base utilisant des PFG ainsi que le comportement du signal lors du premier gradient.

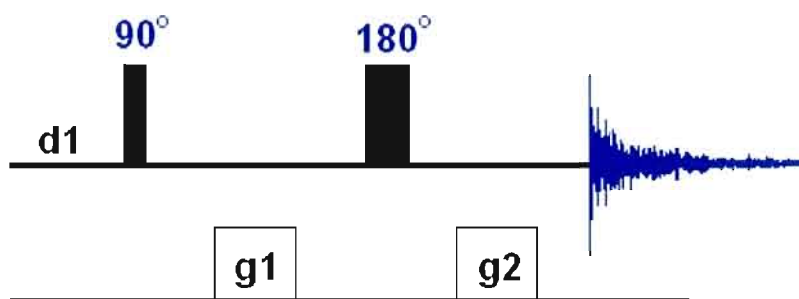


Figure 2.9 : Séquence de l'expérience PFGSE (*Pulsed Field Gradient Spin Echo*). Le premier gradient $g1$ code les spins en leur attribuant une phase dépendante de leur position dans l'échantillon tandis que la seconde impulsion $g2$ permet de rephaser afin de permettre le décodage [34].

Avant l'application de gradients de champ, il y a cohérence de phase des spins. Puis, lors du premier PFG, il y aura distribution de précession car selon leur position en z , les spins ne subiront pas le même champ magnétique. Ainsi, la fréquence de Larmor sera différente en fonction de la localisation spatiale des spins et c'est pour cette raison que les gradients permettront d'encoder la position d'un spin dans l'échantillon analysé. Lorsque le PFG est arrêté, la phase des spins garde en « mémoire » le champ qu'ils viennent de subir. Finalement, un deuxième PFG permettra de rephaser les spins pour permettre la détection. L'effet des gradients sur les spins dépend non seulement de la force du gradient et de sa durée, mais également du rapport gyromagnétique du noyau et de sa position dans l'échantillon. Grâce à cette dernière, il devient possible de mesurer la diffusion d'une molécule. Comme il le sera démontré dans le prochain chapitre, les PFG furent utilisés afin de quantifier l'association d'un peptide provenant du canal hERG et l'association de quatre médicaments cardiotoxiques avec des systèmes bicellaires en utilisant la différence de diffusion dans l'eau et les bicelles.

2.2.2.4 STD (*Saturation Transfert Difference*)

Les expériences de STD permettent de détecter la liaison de petites molécules ligands avec par exemple, des récepteurs macromoléculaires [35]. Les constantes de dissociation pour lesquelles on peut appliquer les STD varient approximativement entre 10^{-3} et 10^{-8} M [36]. Cette méthode peut être utilisée pour déterminer quelle partie du ligand est responsable de la liaison puisque les groupements qui interagissent le plus vont démontrer un effet STD plus prononcé. Le principe de cette méthode repose sur le fait qu'il est possible de sélectivement saturer les protons de la macromolécule en irradiant une région spectrale contenant des résonances de cette macromolécule mais aucun signal de toute autre petite molécule libre. La saturation se propage alors rapidement au travers du système macromoléculaire grâce au phénomène de NOE. Si une plus petite molécule ligand se lie au récepteur, la saturation se propagera également vers de cette petite molécule. Ce phénomène résultera en une atténuation du signal du ligand. En soustrayant le spectre obtenu après transfert de saturation avec le spectre sans saturation, on obtient le spectre STD contenant seulement les résonances du ligand lié [35]. La séquence d'impulsion STD est présentée à la figure 2.10.

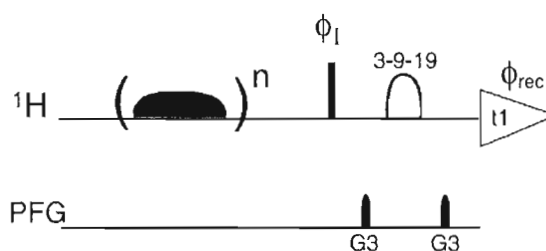


Figure 2.10 : Séquence d'impulsion STD. Une impulsion de forme Gaussienne est utilisée pour l'irradiation sélective et est appliquée n fois. On applique ensuite une impulsion de 90° suivie d'un élément de suppression d'eau (3-9-19) qui inclut deux gradients G3 avant la détection [37].

2.2.3 Étude des systèmes membranaires par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN est une technique qui permet d'étudier des mouvements ayant des temps caractéristiques qui varient entre 10^{-12} et 10^{-1} secondes [38]. Elle représente donc une technique de choix pour l'étude des phospholipides dans les systèmes membranaires. En effet, la RMN permet de détecter un large spectre de mouvements typiques des lipides au sein d'une bicouche. Grâce au phosphore-31 (^{31}P) et au deutérium (^2H), il est possible d'élucider les mécanismes d'interactions des médicaments et/ou du segment extracellulaire Ile⁵⁸³ – Tyr⁵⁹⁷ du hERG avec une bicouche membranaire modèle (Figure 2.11). La RMN du ^{31}P est utilisée afin de sonder les effets des médicaments et de peptides à la surface des membranes (têtes polaires) tandis que la RMN du ^2H permet d'étudier l'impact de ces molécules au niveau du cœur hydrophobe de lipides ayant des chaînes acyle deutérées.

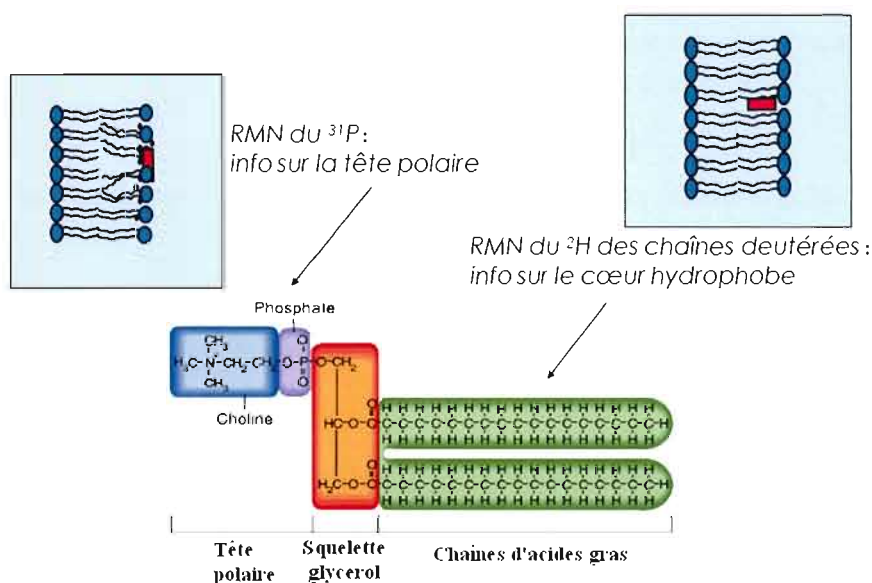


Figure 2.11. Structure d'un phospholipide et schématisation de l'information qu'il est possible de recueillir par RMN du ^{31}P et du ^2H . (Image modifiée de [23])

2.2.3.1 RMN statique du ^{31}P

Dans un système constitué de bicelles orientées avec la normale à la bicouche perpendiculaire à la direction du champ magnétique, la majorité des phospholipides auront leur axe longitudinal orienté à 90° par rapport à B_0 . L'allure du spectre caractéristique d'un tel système est présentée à la figure 2.12 en comparaison avec une vésicule multilamellaire dans laquelle le spectre de poudre représente la distribution des lipides sur une sphère. La résonance de plus faible déplacement chimique correspond à celle des molécules de DMPC situées sur la surface plane du disque tandis que l'autre raie correspond aux molécules de DHPC stabilisant les bords [20]. Ce spectre caractéristique nous informe sur les changements d'orientation et de morphologie de nos bicelles lorsqu'on modifie la température ou lorsqu'on ajoute une molécule (ex. médicament ou peptide) afin d'étudier son interaction avec des membranes modèles.

L'allure du spectre correspond au résultat de l'anisotropie de déplacement chimique. Étant donné que l'énergie du couplage dipolaire dépend de la distance internucléaire, les interactions dipolaires homonucléaires ^{31}P - ^{31}P (distance internucléaire de 5 Å) pourront être négligées. Pour leur part, les interactions dipolaires hétéronucléaires ^{31}P - ^1H (2 Å) auront pour effet d'élargir le spectre. Ces interactions sont toutefois partiellement moyennées par les mouvements des phospholipides au sein des bicelles. De plus, elles sont supprimées par découplage des protons. Le découplage consiste à irradier avec un haut champ de radiofréquences les noyaux responsables des couplages dipolaires avec le noyau d'intérêt. Dans ces conditions, seule l'anisotropie de déplacement chimique gouverne l'allure du spectre de RMN. Dans le cas des bicelles orientées, les mouvements rapides de rotation axiale des phospholipides autour de la normale de la bicouche seront la principale cause de la diminution de l'ADC. Une diminution de l'ADC est donc synonyme d'une augmentation de la dynamique au niveau de la tête polaire des phospholipidiques [39].

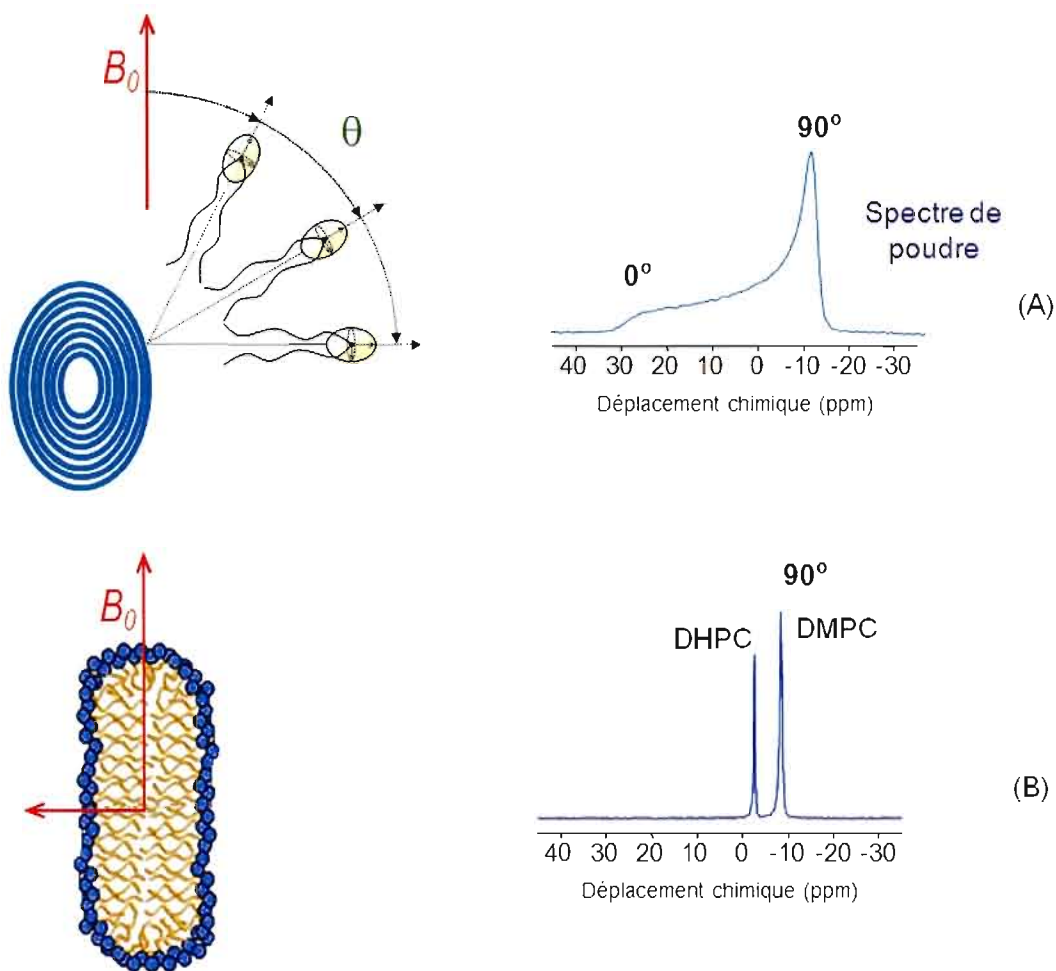


Figure 2.12 : Spectre de RMN du phosphore-31 caractéristiques (A) de vésicules multilamellaires et (B) de systèmes bicellaires. Le déplacement chimique observé est exprimé en partie par million (ppm) par rapport à l'acide phosphorique 85 % (référence fixée à 0 ppm) [40].

2.2.3.2 RMN du deutérium dans l'étude des membranes

L'étude de la région hydrophobe des systèmes membranaires est possible grâce au marquage (^2H) sélectif des chaînes acyle des phospholipides. Le deutérium a une valeur de spin égale à 1 et est donc un noyau quadripolaire. Dans les membranes modèles, l'écart quadripolaire $\Delta\nu_Q$ (la distance entre les doublets)

dépend de la dynamique et de l'orientation du lien carbone-deutéron (C-D) par rapport à la direction de B_0 . Le spectre de RMN du ^2H renseigne donc sur le degré d'ordre d'un lien C-D en particulier ou de l'ensemble des liens C-D de la membrane [28]. De plus, les deutérons situés au bout des chaînes acyle sont caractérisés par une plus grande gamme de mouvements comparativement aux deutérons près de la tête polaire. L'augmentation des mouvements due à la diminution des contraintes stériques implique une augmentation du désordre conformationnel. L'éclatement quadripolaire des deutérons sera de plus en plus moyenné en s'éloignant de la tête polaire (figure 2.13B).

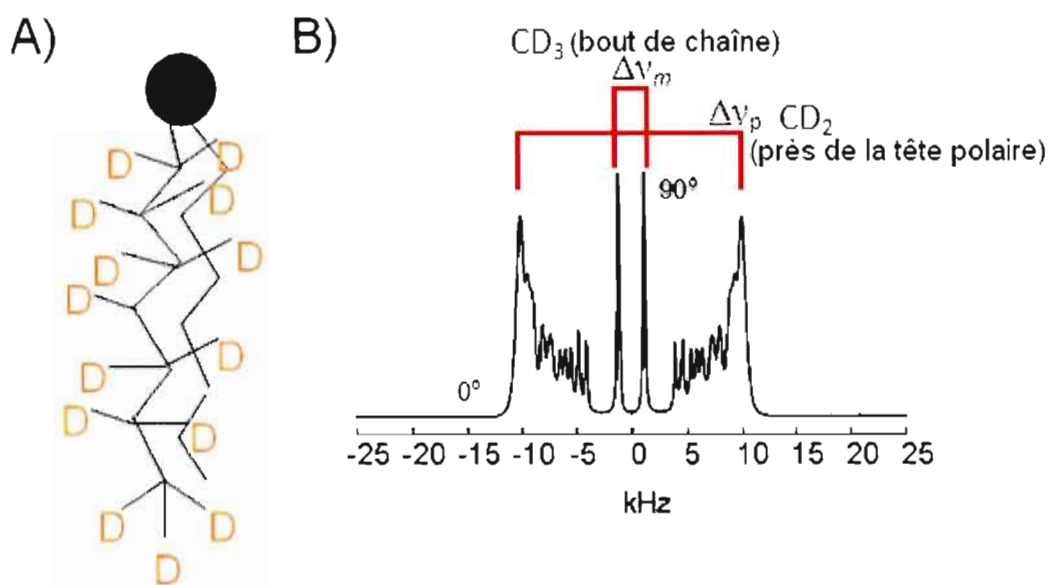


Figure 2.13 : A) Phospholipide deutéré ; B) Spectre RMN en deutérium d'une bicelle constituée de lipides deutérés et éclatement quadripolaire $\Delta\nu_m$ (correspondant au groupement CD_3 en bout de chaîne) et à $\Delta\nu_p$ (correspondant au groupement CD_2 près de la tête polaire). Dans le cas de bicelles orientées, les phospholipides (liens C-D) ont une seule orientation par rapport au champ magnétique. C'est pour cette raison que le spectre ^2H n'a pas l'allure du spectre de poudre observé avec des vésicules [28, 40].

2.3 Étude structurale de peptide/protéines par dichroïsme circulaire

La polarisation de toute onde lumineuse peut se décomposer en deux parties : l'une circulaire droite et l'autre circulaire gauche. En présence de dichroïsme circulaire, l'une des deux composantes sera absorbée plus rapidement que l'autre (voir figure 2.14).

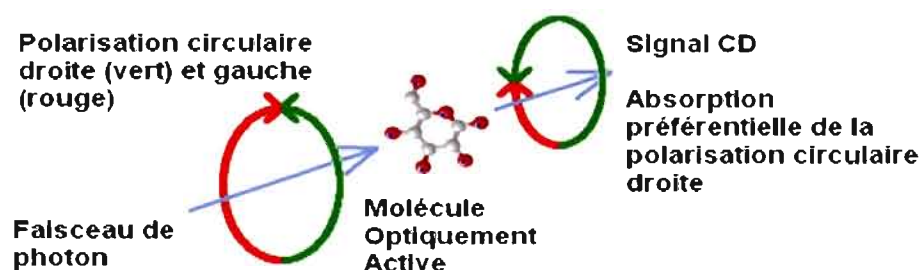


Figure 2.14 : Mesure de l'interaction de la lumière polarisée circulairement avec une molécule optiquement active (Image modifiée à partir de www.jascofrance.fr)

De façon générale, le dichroïsme circulaire apparaît dans toute molécule optiquement active. Parmi ce type de molécules, on retrouve les molécules biologiques qui présentent un dichroïsme circulaire à cause de leur chiralité. C'est le cas de certains sucres et acides aminés et de leurs polymères. La structure secondaire de ces polymères participe aussi au signal dichroïque [41]. La répartition spectrale du dichroïsme circulaire (dans le domaine des ultraviolets) révèle des informations importantes sur la structure secondaire des protéines. Les différentes structures secondaires présenteront des dichroïsmes circulaires caractéristiques qui nous indiqueront la proportion de la protéine dans les conformations en hélice- α , en feuillet- β , en coudes- β et en structure aléatoire (*random coil*). La figure 2.15 présente les spectres caractéristiques des différentes structures secondaires.

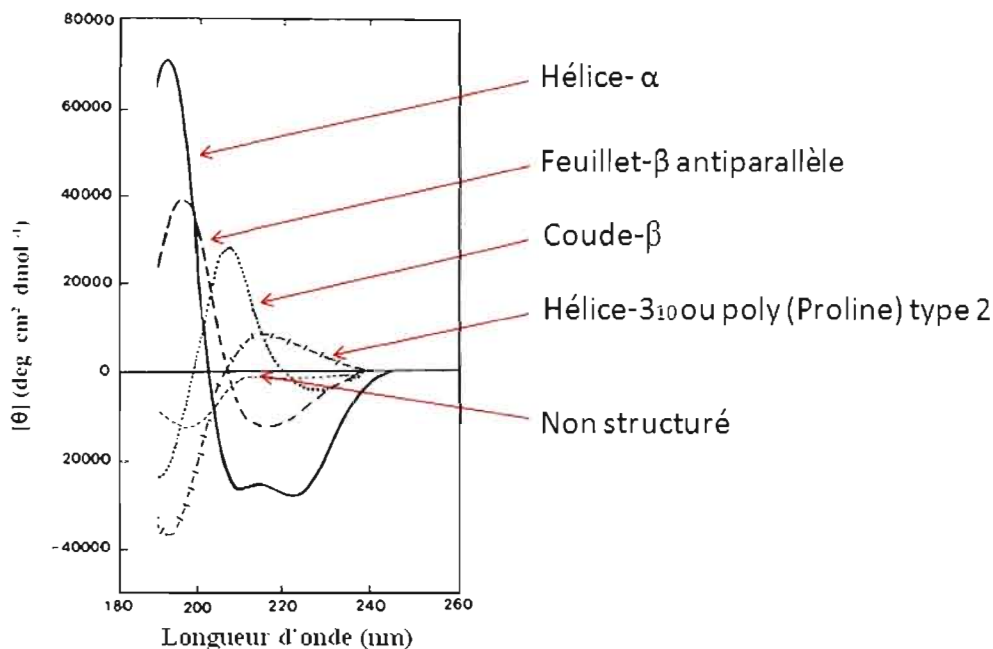


Figure 2.15 : Spectres de CD associés à différents types de structures secondaires. (Image modifiée à partir de [42])

Grâce à cette technique, il est possible d'observer la dénaturation d'une protéine par l'augmentation du signal correspondant à la structure aléatoire et la diminution des signaux d'hélice- α et/ou feuillet- β . On peut également faire l'inverse et observer le repliement d'une protéine afin de déterminer quelle structure secondaire se forme en premier [43]. Cependant, un des inconvénients majeurs associés à cette technique est que l'information obtenue ne permet de déterminer la distribution des structures secondaires détectées le long de la chaîne d'acides aminés parce que le spectre obtenu correspond plutôt à une moyenne des structures secondaires présentes dans la protéine étudiée. Même si le dichroïsme circulaire nous donne moins d'informations sur la structure des protéines que la cristallographie de rayons X ou la RMN des protéines, il permet tout de même de faire des mesures rapidement (en faisant varier la composition du milieu (eau, lipides, solvants), en modifiant la température, le pH, la salinité, etc.), sans nécessiter une grande quantité de protéines, sans analyse compliquée des données et sans marquage isotopique. Le fonctionnement d'un spectropolarimètre permettant de mesurer le dichroïsme circulaire est présenté à la figure 2.16.

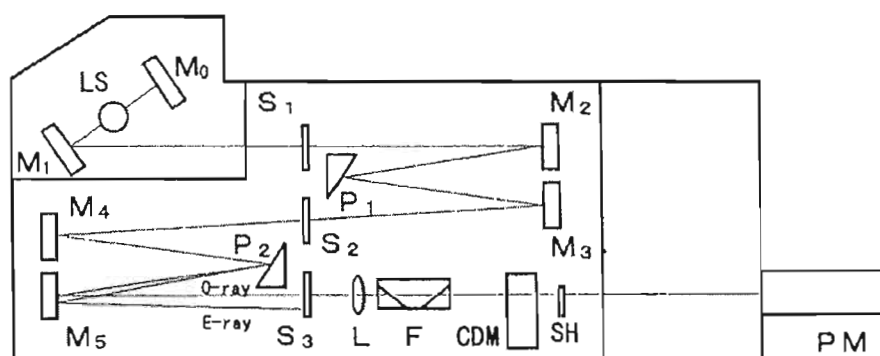


Figure 2.16 : Diagramme du fonctionnement d'un spectropolarimètre (Jasco J-810). La radiation polarisée est produite par le passage de la lumière (provenant de la source LS) au travers de deux prismes (P₁ et P₂) et une série de miroirs (M₀ à M₅) et de fentes (S₁ à S₃). Le rayon ordinaire (O) est ensuite focalisé par une lentille (L) avant de passer au travers un filtre (F) pour se rendre au modulateur (CDM). Les composantes circulairement polarisées sont ensuite dirigées au travers d'un obturateur (SH) jusqu'au compartiment contenant l'échantillon avant d'être détectées par le photomultiplicateur (PM) [42].

CHAPITRE III

Potential role of the membrane in hERG channel functioning and drug-induced long QT syndrome

Étienne Chartrand, Alexandre A. Arnold, Andrée Gravel, Sarah Jenna
et Isabelle Marcotte

Soumis à *Biochimica et Biophysica Acta*, manuscrit # BBAMEM-09-419

Department of Chemistry, Pharmaqam/NanoQAM, Université du Québec à Montréal,
P.O. Box 8888, Downtown Station, Montreal, Canada, H3C 3P8

Contribution de l'auteur principal à l'ensemble de l'article

J'ai réalisé toutes les expériences de l'article présenté dans le présent chapitre. Les expériences de RMN ont été réalisées sous la supervision du Dr. Alexandre Arnold tandis que j'ai effectué seul les expériences de dichroïsme circulaire à l'Université Concordia. J'ai grandement contribué à la rédaction de l'article, surtout au niveau de l'introduction, de la section matériel et méthodes, de même que pour la partie résultat. J'ai également apporté plusieurs éléments de discussion. J'ai réalisé la majorité des figures et tableaux à partir de mes résultats.

3.1 Abstract

The human ether-à-gogo related gene (hERG) potassium channels are located in the myocardium cell membrane where they ensure normal cardiac activity. The binding of drugs to this channel, a side effect known as drug-induced (acquired) long QT syndrome (ALQTS), can lead to arrhythmia or sudden cardiac death. The hERG channel is a unique member of the family of voltage-gated K^+ channels because of the long extracellular loop connecting its transmembrane S5 helix to the pore helix in the pore domain. Considering the proximal position of the S5-P linker to the membrane surface, we have investigated the interaction of its central segment I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ with bicelles. Liquid and solid-state NMR experiments as well as circular dichroism results show a strong affinity of the I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ segment for the membrane where it would sit on the surface with no defined secondary structure. A structural dependence of this segment on model membrane composition was observed. A helical conformation is favoured in detergent micelles and in the presence of negative charges. Our results suggest that the interaction of the S5-P linker with the membrane could participate in the stabilization of transient channel conformations, but helix formation would be triggered by interactions with other hERG domains. Because potential drug binding sites on the S5-P linker have been identified, we have explored the role of this segment in ALQTS. Four LQTS-labile drugs were studied which showed more affinity for the membrane than this hERG segment. Our results, therefore, identify two possible roles for the membrane in channel functioning and ALQTS.

3.2 Introduction

HERG (*human ether-à-go-go-related-gene*) potassium channels are essential for the normal electrical activity of the heart. Located in the myocardium cell membrane, the structure of these voltage-gated K^+ channels (VGK) has never been determined experimentally. Homology models of the hERG K^+ channel have been proposed based on its primary sequence and the X-ray structure of various bacterial K^+ channels [12, 15, 44]. The predicted structure consists of four monomeric

subunits, each containing six transmembrane (TM) spanning helices S1-S6 [8]. The first four helices (S1-S4) comprise the primary voltage sensor while S5 and S6 form the pore domain. The K⁺ selectivity filter and a small pore helix (P) involved in inter-subunits contacts are found on the extracellular loop that links S5 to S6. The loops from each monomer meet into the pore to form the selective K⁺ doorway of the channel [45].

Inherited mutations in the hERG gene can cause the long QT syndrome (LQTS), a cardiac repolarization disorder that predisposes individuals to ventricular arrhythmia that can lead to sudden death. However, A(cquired)LQTS can also be induced by the blockage of the hERG channels by prescription drugs. This side effect has resulted in significant labelling restrictions or drug withdrawal from the market by regulatory agencies worldwide [7, 46]. It is now routine practice in the pharmaceutical industry to test compounds for hERG-channel activity, and LQTS is a common reason for drug failure in early preclinical safety trials [47].

The problem of ALQTS is correlated with the wide spectrum of hERG blockers. Several classes of structurally-different therapeutic molecules such as antibiotics, antihistamines, antipsychotics and antiarrhythmics have LQTS side effects [4, 5, 48, 49]. Electrophysiology and *in silico* studies show that most hERG-channel blockers would exert their activity by binding one or several sites located in the pore domain. This region is composed of S5 and S6 which inner cavity is lined by aromatic and polar residues that permit hydrophobic, electrostatic and polar interactions with a wide range of compounds [8-12, 50]. Tyr⁶⁵² and Phe⁶⁵⁶ located on S6 are especially important for the binding of many drugs [11, 12, 50-53]. The role of the extracellular S5-P linker has also been pointed out with residues such as Ser⁶²⁰ [10], Thr⁶²³, Ser⁶²⁴ and Val⁶²⁵ [50] being involved in the binding of LQTS-prone drugs. Toxins such as ErgToxin and BeKm-1 are known to bind to this region of hERG while they do not bind to other members of the VGK family [54, 55]. However, some toxins such as agitoxin and charybdotoxin are known to bind the S5-P loop of VGK channels but not the hERG.

The hERG channel is a unique member of the VGK family because of its long extracellular loop connecting S5 to the pore helix, i.e. 43 amino acid residues vs. 12-23 residues in most K⁺ channels [56, 57]. Liu *et al.* [14] showed that mutations in the 15 amino-acid residue central segment I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ of the S5-P linker lead to hERG channel dysfunction. They thus suggested its role in the degree of inactivation and K⁺ selectivity [58]. Their analysis of these mutations also suggested a helical periodicity of I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ [14]. Recent nuclear magnetic resonance (NMR) structural work performed on this segment also showed a helical conformation in sodium dodecylsulfate (SDS) and dodecylphosphocholine (DPC) micelles [57, 59]. A model was proposed in which the NH₂-terminal would be located close to the pore entrance, with a 20Å 583-597 helix that would be sufficiently long to interact with the voltage-sensing domain [14]. From these studies, it was suggested that the I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ extracellular segment of the hERG would undergo dynamical structural changes, approaching the pore entrance to participate to the function of the channel outer mouth [57, 58]. It is clear that this long hERG S5-P linker is a critical region of the channel, therefore it is of great importance to identify its dynamic and structural role in the channel function.

Considering the proximal position of the S5-P linker to the membrane surface, the aim of this work was to investigate the interaction of the I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ segment of hERG with model phospholipid membranes. To the best of our knowledge, no information regarding its interactions with membrane has been published. Moreover, to explore the role of this S5-P linker moiety on the drug-induced LQTS, we have also studied its interaction with LQTS-labile drugs. This was done by combining liquid- and solid-state NMR and using bicelles as model biomembranes. Bicelles are generally composed of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dihexanoylphosphatidylcholine (DHPC) in a molar ratio (q) which determines the membrane size, shape and properties [20, 21, 60]. By adjusting the q ratio, fast-tumbling and oriented bicelles (q>2.3) can be prepared, therefore these membranes are tunable for liquid- and solid-state NMR experiments, respectively. Similarly to natural membranes, bicelles have a planar surface and their lipids are in the liquid-crystal phase.

Four drugs with reported QT prolongation effect were selected for this study because of their different structures, octanol-water partition coefficient (logP), and pharmacological classes, as shown in Table 1.2. Bepridil, a calcium antagonist initially developed as an antianginal agent, was withdrawn from the market for causing Torsades de Pointes (TdP) [61-63]. Diphenhydramine and cetirizine are respectively first- and second generation antihistamines that showed inhibition of hERG channels [64-66], while pentamidine is an antiprotozoal agent reported to cause QT prolongation and TdP when given in intravenous form [67-69].

Using ^1H liquid-state NMR with Pulsed Field Gradient (PFG) self-diffusion measurements, the membrane affinity of I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ and the drugs, as well as the drug/segment association are evaluated. Saturation transfer difference (STD) ^1H NMR experiments are used to determine the location of the hERG segment in the membrane. Two-dimensional ^1H NMR and circular dichroism spectra provide structural data on the peptide in water, bicelles and various detergent micelles. Finally, solid-state ^{31}P and ^2H NMR are employed to probe the effect of the peptide and the cardiotoxic drugs on the polar and hydrophobic regions of the membrane, respectively.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Materials

The hERG extracellular linker segment with sequence IGWLHNLGDQIGKPY was synthesized by GenScript Corporation (Piscataway, NJ, USA) with >95% purity. Protonated and deuterated dimyristoyl- and dihexanoylphosphatidylcholine (DMPC, DMPC- d_{54} , DHPC, DHPC- d_{22}), dimyristoylphosphatidylserine (DMPS), dodecylphosphocholine (DPC), 1-myristoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso-myristoylphosphatidylcholine, LMPC) and 1-myristoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoglycerol sodium salt (lyso-myristoylphosphatidylglycerol, LMPG) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) while deuterated sodium dodecylsulfate (SDS- d_{25}), pentamidine isothionate, bepridil, cetirizine and

diphenhydramine hydrochlorides were obtained from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada) and used without further purification.

3.3.2 Sample preparation

Nuclear magnetic resonance

Bicelles were prepared by mixing freeze-dried DMPC and DHPC with the desired long-to-short-chain (q) ratio in aqueous solution, with or without hERG segment, and submitted to a series of three freeze (liquid N_2)/thaw ($50^\circ C$)/vortex shaking cycles until a transparent non-viscous solution was obtained. Bicelles/PS for circular dichroism (CD) analysis were prepared by substitution of 25 or 50% of DMPC with the negatively-charged DMPS. Hydration percentages (weight/weight) were as follows: 99% for CD, 86% for high-resolution NMR and 80% for solid-state NMR, and q ratios were as follows: $q=0.5$ for both translational diffusion and saturation transfer difference measurements, $q=1$ for chemical shift assignment and analysis, and $q=3.5$ for solid-state NMR experiments. Total lipid/peptide (L/P) molar ratios of 25:1 and 100:1 were used for solid-state NMR, and 50:1 for high-resolution 1H NMR. In all NMR experiments the peptide concentration was 5 mM and the surfactant concentration was, thus, maintained well above the critical micelle concentration (CMC) of DHPC in the bicelle mixture (15 mM) [70, 71]. The same sample preparation was applied to micelles systems. Because this segment is believed to be dynamic and possibly involved in the K^+ channel function, deionized water (pH=5.5) was used to avoid salt interference [57]. 1H diffusion NMR experiments were carried out in D_2O while all high-resolution NMR experiments were done using 10% D_2O . All two-dimensional NMR experiments were carried out using lipids and SDS with deuterated acyl chains to minimize the contribution of the lipid resonances to the 1H NMR spectra. Oriented bicelles for solid-state 2H NMR were prepared with DMPC- d_{54} in deuterium-depleted H_2O .

Circular dichroism

Bicelles and micelles were prepared as described above. Bicelles containing DMPS (Bicelles/PS) were made by substitution of 25% of DMPC with the negatively-charged DMPS. For all samples, a hydration percentage of 99% was employed. The concentration of hERG I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ segment was kept to 0.13 mg/ml (76 μ M) while lipid or surfactant concentrations were 33 mM (bicelles), 22 mM (Bicelles/PS), 30 mM (DHPC), 15 mM (DPC, LMPC, LMPG). All lipid or surfactant concentrations were thus kept above their CMC [70, 71]. The surfactant/peptide molar ratio was 200:1 to provide an appropriate micelle:peptide stoichiometry that limits possible peptide aggregation. In the case of bicelles ($q=1$), a total lipid-to-peptide molar ratio of 600:1 was employed to ensure that at least two bicelles were available per I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ segment in the sample. This can be assessed knowing concentration of DMPC and DHPC, the q ratio and the surface area of phosphatidylcholines [72].

3.3.3 Solution and solid-state NMR

All spectra were recorded on a hybrid Varian Inova Unity 600 (Varian, Walnut Creek, CA, USA) operating at frequencies of 599.95 MHz for ¹H, 246.86 MHz for ³¹P and 92.125 MHz for ²H. The ¹H chemical shifts were internally referenced by adding a small amount of 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acid (DSS) set to 0.0 ppm. All ³¹P NMR spectra were externally referenced with respect to the signal of 85% phosphoric acid set to 0 ppm.

Pulsed-field gradient (PFG) diffusion experiments

¹H NMR self-diffusion measurements at 25°C were performed with a double-resonance 3-mm indirect z-gradient probe using the water-suppressed LED pulse sequence (water-sLED) [73]. A hard 90° pulse of 5.5 μ s was used. The gradient pulse duration δ was 6 ms and diffusion times (Δ) were varied between 100 and 150 ms to ensure that the echo intensities were attenuated by at least 80%. 24000 data points were obtained and typically 48 scans were acquired for each selected gradient strength with a recycle delay of 5.0 s. A complete attenuation curve was

obtained by measuring 15 gradient strengths which were linearly incremented between 2.1 and 31.5 G/cm. Translational diffusion coefficients (D_s) were calculated using the following equation [73]:

$$A(G) = A(0)\exp [-(\gamma\delta G)^2(\Delta-\delta/3)D_s] \quad (3.1)$$

where $A(G)$ is the echo amplitude, γ is the ^1H gyromagnetic ratio. The gradient strength was calibrated using back calculation of the coil constant from a measurement of the diffusion constant of H_2O traces in D_2O using $D_s = 1.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ at 25°C [74].

Saturation transfer difference (STD) experiments

The STD experiments consisted of a train of 50 ms Gaussian selective pulses separated by 1 ms delays and followed by a WET water suppression and detection [35-37]. The saturation frequencies were alternated between the resonance to be saturated and -25 ppm. The Gaussian pulses were applied with radio-frequency field strength of 120 Hz and saturation times were varied between 250 ms and 5 s. The recycle delay was 3s.

High-resolution ^1H two-dimensional experiments

^1H total correlation spectroscopy (TOCSY) spectra were recorded with a 90° pulse of 5.5 μs , and spin-lock times of 25, 50 and 100 ms with MLEV17 spin-lock fields of 15 kHz [75]. A spectral width of 8 kHz was used in both dimensions with 512 and 1024 complex data points in the indirect and direct dimensions, respectively. 16 transients were accumulated with a repetition delay of 1s. Two-dimensional nuclear Overhauser spectroscopy (NOESY) spectra [76, 77] were recorded using a pulse length of 5.5 μs with mixing times varying from 100 to 750 ms. A spectral width of 8 kHz was used in both dimensions with 1024 data points in F2 and 512 increments in F1. A total of 16 transients were recorded with a repetition delay of 1 s.

Solid-state NMR experiments (SS-NMR)

Solid-state ^{31}P NMR spectra were recorded using a phase-cycled Hahn echo pulse sequence with gated broadband proton continuous wave decoupling at a field strength of 50 kHz [78]. The interpulse delays were 30 μs and typically 4800 scans were acquired with a recycle delay of 3 s. ^2H NMR spectra were obtained using a solid echo pulse sequence [79] with an interpulse delay of 45 μs and repetition delay of 500 ms. At least 8000 data points were obtained and typically 5000 scans were acquired. The quality of the bicelles' magnetic orientation with or without the peptide was sufficient to enable the direct measurement of quadrupolar splittings on the ^2H spectra with no de-Pakeing.

Data processing

Diffusion, STD and SS-NMR data were processed using matNMR [80]. High-resolution 2D NMR spectra were processed using the NMRPipe package [81] and analyzed with the software NMRView for chemical shift assignment and NOE calibrations [82].

3.3.4 Circular dichroism experiments

Circular dichroism (CD) spectropolarimetry

CD analyses were performed on a JASCO J-815 spectrometer (Jasco Inc., Easton, MD, USA) at $\sim 23^\circ\text{C}$. Data were collected using a 1-mm 100 QS cuvette over the wavelength range 190-250 nm and with a resolution of 0.2 nm, a bandwidth of 1 nm, and a response time of 0.5 s. The signal was averaged over 5 scans with blank subtraction of the lipid or surfactant suspension. In order to estimate the contributions of different structural elements, CD spectra were deconvoluted using DICHROWEB and the SELCON3 or CONTIN-LL algorithms [83].

3.4 Results

3.4.1 Interaction of I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ with model membranes

3.4.1.1 Does this extracellular linker segment bind even weakly to the membrane?

The central segment I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ of the S5-P linker of the hERG channel displays a strong amphipathicity, therefore its potential binding to the membrane needs to be addressed. As a first step, we have recorded ¹H NMR spectra of this peptide in water and in the presence of membrane mimetic milieus. Initially, TOCSY spectra (not shown) were acquired to assign the ¹H chemical shifts of the hERG segment in water, bicelles and SDS micelles.

The 1D ¹H NMR spectra show major changes for the amide and aromatic regions when I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ is in deuterated bicelles (Fig. 3.1B) and SDS-d₂₅ micelles (Fig. 3.1C). In these conditions resonances are shifted and considerably broadened as compared to the peptide in water (Fig. 3.1A). This most likely results from a reduced mobility of the peptide upon binding to large bicellar or micellar objects.

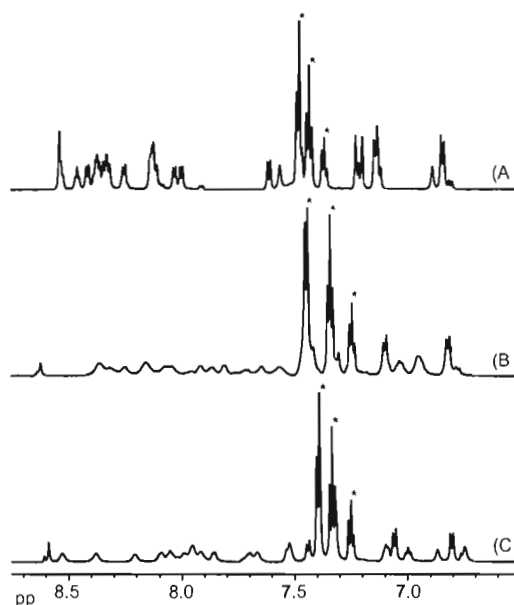


Figure 3.1: Amide and aromatic regions of the ¹H NMR spectra of hERG (583-597) in A) water, B) bicelles, C) SDS-d₂₅. The asterisk identifies the resonances of the cardiotoxic drug diphenhydramine.

In order to quantify the affinity of this hERG segment for the membrane, we have determined the fraction of peptide bound to the membrane. This was done by measuring the self-diffusion coefficients of the peptide in H₂O and in the presence of bicelles by ¹H NMR using pulsed field gradient stimulated echo (PFGSTE) experiments [37, 84-86]. If the hERG segment is in rapid exchange on the NMR timescale between the free and the bound states and assuming a two-site model as proposed by Stilbs (1982), the diffusion coefficient (D_{obs}) of the bicelle-associated peptide will be an average of diffusion coefficients for the free (D_{free}) and bound (D_{bound}) states. In our study, D_{free} refers to the diffusion coefficient of the peptide in water and D_{bound} to the diffusion coefficient of the bicelles in water. Following such a model, the percentage of peptide bound to the membrane can be calculated as follows:

$$\frac{D_{obs} - D_{free}^{\phi}}{D_{bound} - D_{free}^{\phi}} \times 100 \quad (3.2)$$

This model can also be applied to assess the binding of a drug with a membrane or a peptide.

D_{free}^{ϕ} is the corrected free diffusion coefficient because in a bicelle environment, the diffusion of the free hERG peptide (or drug) in the aqueous solution can be hindered by the actual presence of the bicelles. It is thus essential to correct D_{free} by introducing an obstruction factor A that can be defined, for spherical objects, according to the following equation:

$$A = 1 / (1 + 0.5\phi) \quad (3.3)$$

where ϕ is the volume fraction of the obstructing particles. A factor $\langle A \rangle$ of 0.935 can be calculated for a 14% w/w bicelle solution at 20°C using a spherical model as proposed by Gaemers and Bax [87]. Because a radius of 43 Å is predicted for bicelles with $q = 0.5$ and a bilayer thickness of ~40 Å [88], we have approximated the bicelles as spherical objects and used this correction factor in our diffusion measurement calculation as was done for the neuropeptide met-enkephalin [85].

Since there are no analytical expressions to calculate obstruction factors for discoidal objects, the best approximation for which an analytical expression exists would be spheroids [87, 89], leading to an obstruction factor of 0.925. The commonly used spherical approximation, thus, appears to be excellent for isotropic bicelles with $q=0.5$.

The value of D_{obs} used in the calculations was the average of the diffusion coefficients obtained for three peptide resonances. Although the diffusion coefficient of bicelles can be measured with the PFGSTE experiment from the signals of DMPC/DHPC directly, it can also be measured more accurately and conveniently from the signal of a small amount of a hydrophobic probe molecule known to be completely partitioned within the hydrophobic core of the bicelles. Indeed, in the case of bicelles with low q ratios, the lipids are rapidly exchanging between the solution and the micelle-like object [90]. As a consequence, the apparent diffusion coefficient obtained directly from lipid signals is usually from 5% to 10% higher than the actual diffusion coefficient of bicelles determined from the diffusion of the probe molecule [84]. In this work, a small amount of hexamethyldisilane (HMDS) was added to the bicellar samples and its resonance used to measure the diffusion of the whole bicelle. HMDS has been widely used for this purpose in diffusion studies of micellar and bicellar systems [84, 91].

Table 3.1 presents the diffusion coefficients measured for pure bicelles, free and membrane-associated $^{583}\text{-Y}^{597}$ peptide as well as its percentage of association to the bicelles as calculated from equation (3.2). All the plots of the normalized natural log signal intensity versus squared gradient strength G^2 were linear (not shown), consistent with a fast-exchange scenario (or a single-state case). This also indicates that there is no influence of intermolecular NOEs on the diffusion results [92, 93]. The translational diffusion coefficients for the bicelles are in good agreement with the values reported in the literature [37, 90]. Our results show that 100% of the peptide would bind to the model membranes at the lipid/peptide (L/P) molar ratio studied (100:1). This constitutes the extreme case of the model

presented in equation (3.2) in which the association equilibrium is displaced towards a bound state, i.e. a single state model.

Table 3.1: Translational diffusion coefficients and calculated fraction of bound hERG peptide to bicelles and of cardiotoxic drugs to hERG peptide in water or in the presence of bicelles and to model membranes.

System	$D_{obs} (\times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$ (fraction bound)			
	in water	with Bicelles	with I ⁵⁸³ -Y ⁵⁹⁷	with Bicelle/I ⁵⁸³ -Y ⁵⁹⁷
Bicelles	0.29	---	---	---
hERG I ⁵⁸³ -Y ⁵⁹⁷	1.72	0.31 98%	---	---
bepridil	3.82	0.28 100%	3.43 18%	---
cetirizine	3.97	0.33 99%	3.70 13%	---
pentamidine	3.57	0.37 97%	3.27 16%	---
diphenhydramine	4.94	0.42 97%	4.68 9%	0.38 98%

3.4.1.2 Is the membrane perturbed by the hERG segment?

Considering the strong affinity of the I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ segment of the extracellular hERG loop, we have examined its effect on the phospholipid membrane. ³¹P and ²H SS-NMR experiments are well-established techniques to study the effect of peptides or drugs on model and natural membranes. Due to the high NMR sensitivity and 100% natural abundance of the ³¹P isotope, the presence of a single phosphorus nucleus in the phospholipid headgroup allows exploiting ³¹P NMR to obtain valuable information on the polar region of lipid membranes [39]. The hydrophobic region on the other hand can be studied by ²H SS-NMR using phospholipids with deuterated acyl chains. The quadrupolar interaction is highly sensitive to motions in the bilayer, thus perturbations of the hydrophobic core can be probed [28, 94].

Fig. 3.2A presents the ^{31}P SS-NMR spectra of DMPC- d_{54} /DHPC bicelles with and without the hERG peptide at 37°C. These spectra are typical of well-oriented bilayers with the normal perpendicular to the direction of the magnetic field. As assigned in previous work [20], the upfield resonance corresponds to the long-chain DMPC whereas DHPC resonance appears at the downfield side of the spectrum. This can be explained by the reorientation or fast lateral diffusion of the short-chain phospholipids on the highly curved region formed by the bicelle rim [95, 96] or DHPC-rich defects of a perforated lamellae [97]. Fig. 3.2A shows that the hERG peptide has an effect on both DMPC and DHPC resonances in bicelles at a L/P ratio of 100:1 as seen by changes in the phospholipid chemical shifts, i.e. -5.91 to -4.53 ppm for DHPC and -12.47 to -9.75 ppm for DMPC. These changes could be explained by an effect of I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ on the lipid bicelle dynamics, to which could be superimposed a deshielding effect of charged or aromatic moieties in the phosphorus atom vicinity. A broadening of the phospholipid resonances is also observed when the hERG segment is added to the bicelles, with an additional upfield shoulder on the DMPC resonance. This peak broadening could result from a greater distribution in bicelle orientation in the presence of the peptide (mosaic spread) [98]. A strong perturbation of the headgroup region of the membrane is thus evidenced and this effect was even more substantial at a L/P of 25:1 where the bicelle morphology appeared to be destroyed (data not shown).

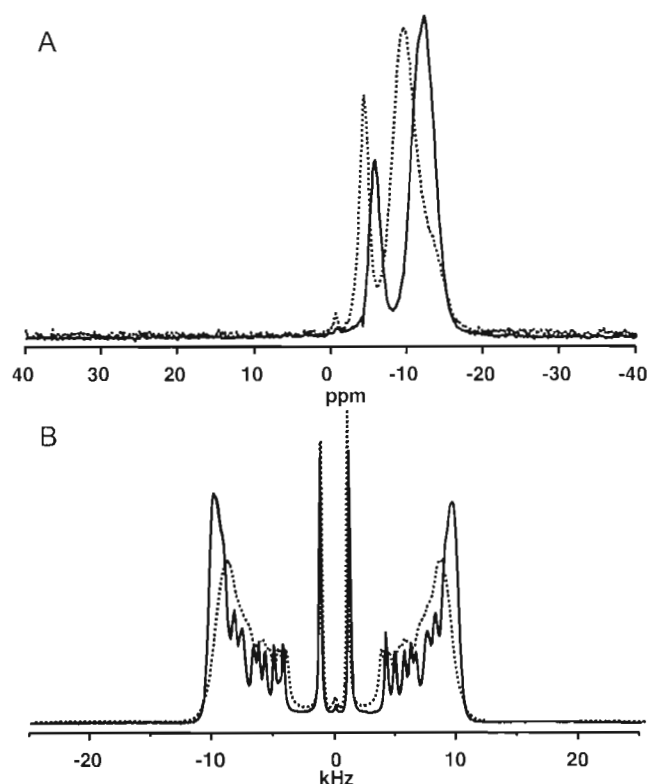


Figure 3.2: ^{31}P (A) and ^2H (B) ssNMR spectra of DMPC/DHPC bicelles ($q=3.5$) (black line) and spectrum of DMPC/DHPC bicelles + hERG peptide (100:1) at 37°C (dashed line)

The ^2H spectra of DMPC- d_{54} bicelles at 37°C with and without the I 583 -Y 597 are shown in Fig. 3.2B. Again, these spectra are typical of bicelles with their lipid bilayer normal oriented perpendicularly to the magnetic field direction [20, 21]. Well-defined doublets can be attributed to most of the deuterons along the lipid acyl chain, with the innermost doublet ascribed to the terminal CD_3 and the largest quadrupolar splitting to CD_2 attached to the glycerol backbone near the polar-apolar interface. The bicelle orientation is preserved when the hERG peptide is incorporated in a L/P ratio of 100:1. This is not the case for high segment proportions (L/P = 25:1) where the bicelle orientation is totally lost (not shown). The resolution of the doublet for the various deuterium positions is decreased when the hERG peptide interacts with the bicelles. This could be attributed to an increase in mosaic spread of bicelle orientation, as possibly suggested by ^{31}P NMR, or changes in transverse relaxation.

To better understand the effect of the hERG segment on the hydrophobic core of the bilayer, we have plotted the quadrupolar splitting ($\Delta\nu_Q$) values along DMPC acyl chains. Changes in $\Delta\nu_Q$ values allows determination of variations in the lipid chain order [28]. The measured $\Delta\nu_Q$ values shown in Fig. 3.3 display significant changes upon addition of the hERG segment to the bicelles. On average, this peptide decreases $\Delta\nu_Q$ values by ~10% in the characteristic plateau region closer to the headgroup for a L/P ratio of 100:1, while C-D₂ bonds deeper in the bilayer are weakly affected. Although this difference of perturbation along the acyl chains suggests a non-transmembrane orientation of the peptide, the center of the bilayer is intrinsically disordered, thus less sensitive to perturbations. Therefore the orientation of hERG I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ in the bicelles has been ascertained by conducting additional NMR experiments described in the next section.

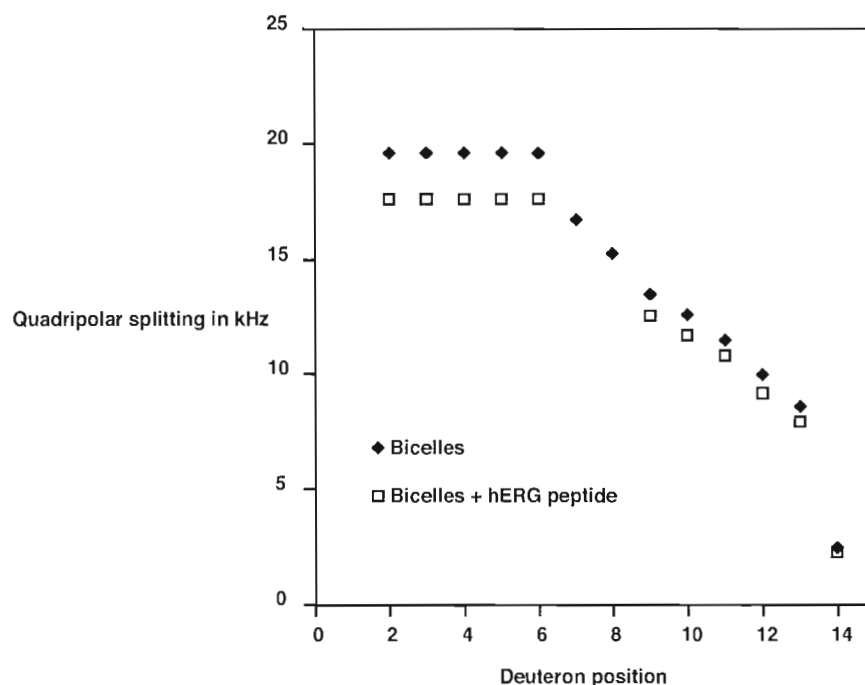


Figure 3.3: Quadrupolar splitting (in kHz) versus deuteron position of the DMPC-d₅₄ acyl chains for bicelles and bicelles + hERG peptide.

3.4.1.3 Does the hERG I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ adopt a preferred orientation with respect to the membrane?

Both the liquid-state NMR translational diffusion measurements and SS- NMR experiments presented in the preceding sections indicate a strong interaction of the hERG extracellular linker segment with the membrane. The ³¹P and ²H SS-NMR experiments show that the membrane is strongly perturbed and it is worthwhile to examine whether the peptide adopts a preferred orientation in the bilayer. For this purpose, we have carried out STD experiments [35] on bicelles in the presence of hERG I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷. In these experiments, specific lipid resonances are saturated and the effect of this saturation on the hERG segment resonances is monitored. More specifically, we have saturated lipid signals from the headgroup (choline), interface (glycerol) and hydrophobic regions (terminal methyl) and monitored the variations in the saturation transfer build up and maximum values for different residues along the peptide. It was thus possible to assess its position inside the membrane, as was done by Wang, Lind and colleagues [37, 99]. DMPC/DHPC-d₂₂ bicelles were employed for STD experiments in order to probe the peptide penetration in the planar section of the bilayer and minimize contacts with high- curvature regions.

Fig. 3.4 shows the saturation transfer curves of the H_N protons for Trp⁵⁸⁵, Asn⁵⁸⁸, Asp⁵⁹¹, Ile⁵⁹³ and Tyr⁵⁹⁷ when the choline, glycerol and terminal methyl groups are saturated. These residues were chosen so as to span the complete length of the peptide. In all cases, the saturation transfers are efficient with maximum plateau values close to 0.3. These results are consistent with the previously determined scenario in which the peptide is strongly bound to the bilayer [36]. In effect, the saturation transfer will increase as the equilibrium between the bound and free states is displaced towards the bound form [36]. For residues close to the N and C terminals (Trp⁵⁸⁵ and Tyr⁵⁹⁷), the transfer from the lipid terminal methyl group is very weak or null and maximum to the choline protons. Note that for both these residues, the choline resonance at 3.25 ppm falls close to the H_β resonances which could be directly saturated. Therefore, it is important to assess the penetration of the residue in the membrane by comparing saturation transfers from three different lipid sites.

Should one of these saturation curves be overestimated, the two other would hold. For the amide proton of residues 588, 591, 595 and 597 the maximum saturation transfer takes place at the glycerol position, whereas the transfer from the choline group decreases when going from Asn⁵⁸⁸ to Lys⁵⁹⁵ then increases for Tyr⁵⁹⁷. Ile⁵⁹³ shows the highest saturation transfer from the choline headgroup. The saturation transferred from the lipid methyl groups remains constant for central residues 588 and 591, decreases for Ile⁵⁹³ and is null for the terminal Tyr⁵⁹⁷.

The trends extracted from the analysis of Fig. 3.4 indicate that the peptide does not span the membrane and remains in the headgroup region in the vicinity of the glycerol interface. It can be tentatively proposed that the central part of the peptide is buried deeper in the membrane than the terminal parts, however, the interpretation of this data in terms of accurate distances is difficult as spin diffusion effects cannot be ruled out [37, 99], in particular for such large objects as peptide/bicelle systems with slow correlation times. Spin diffusion can take place within the phospholipids, leading to an indirect saturation transfer to the peptide from a part of the lipid that is not directly in contact with the saturated lipid moiety. To quantify this possible effect, we have measured spin diffusion within DMPC by monitoring the STD signal of the terminal methyl group when the choline protons were saturated and *vice versa*. Our data (not shown) indicate that this saturation transfer is negligible since it is less than 3% of the maximum lipid-peptide saturation transfer. It should be noted that no peptide-lipid cross peaks could be detected in the 2D NOESY spectra with mixing times up to 750 ms (data not shown). We suggest that fast dynamics and longitudinal relaxation during the NOE mixing time could result in cross peaks too weak to be detected.

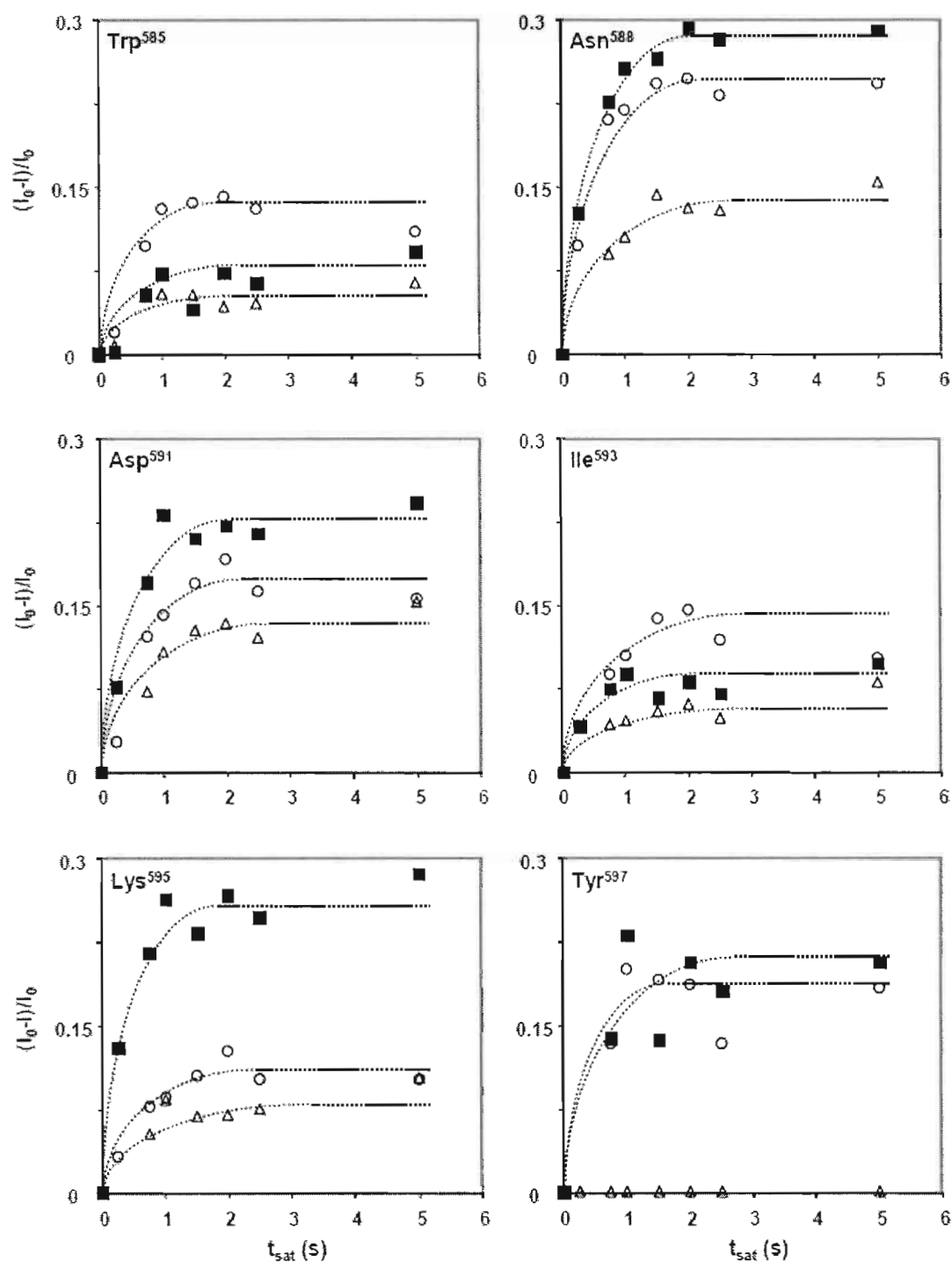


Figure 3.4: Observed STD on HN protons for selected residues when choline (○), glycerol (■) or terminal methyl (Δ) lipid resonances are saturated.

3.4.1.4 Does the membrane environment influence I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ structure?

Clearly, the previous interpretation of the STD experiments raises the question as to what structure this hERG extracellular loop segment adopts when interacting with the membrane. The structure of the I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ segment, as part of longer hERG segments, has recently been elucidated in water and SDS micelles by Torres *et al.* [59], and in water, DPC and SDS micelles by Jiang *et al.* (2005) [57]. Using CD and NMR, both studies determined that the hERG S5-P loop was unstructured in water and formed an α -helix from residues 585 to 593 [59] or an α -helix from residues 583 to 590 and a 3_{10} -helix from positions 591 to 593 [57]. These differences hint to potential structural changes as a function of the membrane milieu. In order to verify any particular structural behaviour of the S5-P segment in membranes, CD studies were carried out with hERG I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ segment in various membrane mimetic environments frequently used in membrane protein structure determination [100]. Negatively-charged SDS and LMPG micelles, zwitterionic DPC, LMPC and DHPC micelles as well as DMPC/DHPC bicelles were evaluated. LMPC, LMPG and DHPC are the most lipid-like surfactants [100]. Because a helical structure of the S5-P segment was reported in SDS micelles, bicelles with 25% (Bicelles/PS25%) and 50% (Bicelles/PS50%) of negatively-charged DMPS were also used to verify the effect of negative charges on the segment structure.

Our CD results (Fig. 3.5) clearly demonstrate that the membrane mimetic environment can influence the structure of the hERG peptide I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷. First, an α -helical structure is favoured in SDS, DPC, LMPG and LMPC micelles as suggested by the positive ellipticity seen between 190 and 195 nm and a negative minimum at ~205 and 222 nm. In order to quantify the contributions of different structural elements, CD spectra were analyzed with the DichroWeb program [83]. According to this analysis, the hERG peptide would be 57% α -helical in SDS and LMPG, 54% in DPC and 61% in LMPC micelles. These results are consistent with previous work published [57],[59]. Fig. 3.5 shows that the hERG loop segment does not adopt an α -helical structure in water or DHPC micelles. The CD spectra measured in bicelles shows a higher residual molar ellipticity between 190 and 195 nm and a decrease of

intensity between 210 and 220 nm as compared to the pure random coil signature. This could be attributed to a small proportion of α -helices. These spectra are

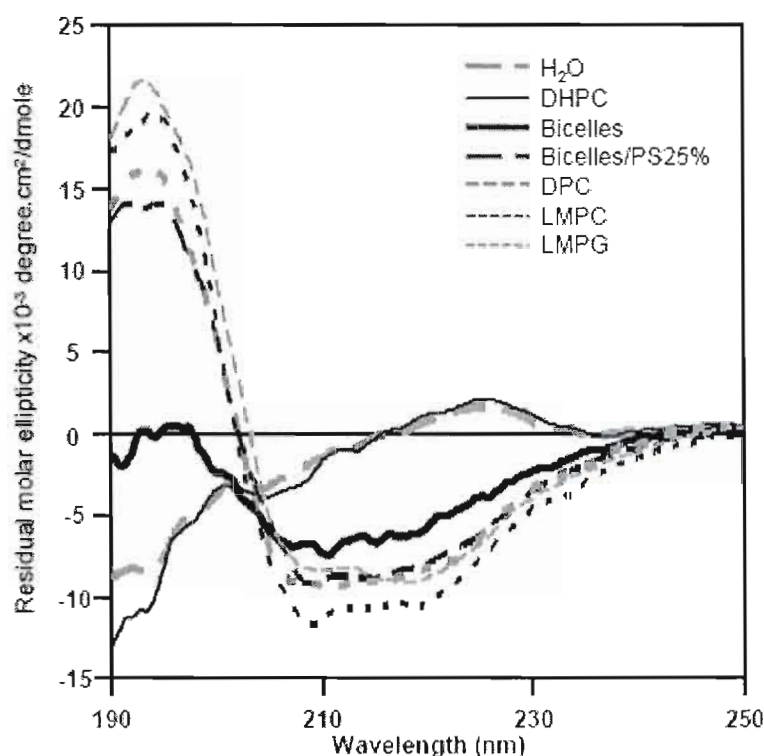


Figure 3.5: Circular dichroism spectra of hERG (583-597) in H₂O (pH=5.5) and in various membrane mimetic environments: DMPC/DHPC bicelles, bicelles with 25 mol% DMPS, DHPC, DPC, LMPC and LMPG micelles.

therefore not characteristic of a purely unstructured peptide. DichroWeb deconvolution of I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ CD spectrum in bicelles indicates an increased contribution of helices (30%), strands (20%) and turns (20%) while the “unordered” contribution is smaller as compared to the peptide spectrum recorded in water or DHPC. Interestingly, spectra obtained in negatively charged bicelles made of 25 and 50 mol% (not shown) of DMPS, respectively. Despite the maximum at ~225 nm and the presence, in the hERG segment, of a glutamine residue which can have propensity to adopt a polyproline II conformation, the possibility of such secondary structure for

the peptide in water and DHPC micelles can be excluded because of the absence of a negative band centered at ~205 nm [101].

Because phosphatidylcholines are highly abundant in cardiomyocytes [102, 103], we have further investigated the structure of the hERG I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ segment in zwitterionic DMPC/DHPC bicelles using 2D ¹H NMR experiments. In contrast to surfactant micelles, bicelles display a planar bilayer region that is similar to that of biomembranes. H_α secondary chemical shifts can be used as a first step for structural characterization. As was shown by Wishart *et al.* [104], a negative deviation of the H_α chemical shift value from random coil values is indicative of an α-helical structure. Fig. 3.6A compares the H_α secondary chemical shifts of the I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ in bicelles, SDS micelles and water obtained from TOCSY spectra. All backbone resonances could be assigned except HN of Ile⁵⁸³ and Gly⁵⁸⁴ and H_α resonances of Gly⁵⁸⁴ and Leu⁵⁸⁹, possibly due to signal overlap within the peptide or from the protonated phospholipid headgroups. Virtually all sidechain resonances (96%) could be assigned. Examination of Fig. 3.6A shows that the H_α chemical shifts of the hERG segment in bicelles follow the same trend as those obtained in SDS micelles, with similar although generally smaller deviations from random coil values. Although the H_α secondary chemical shifts indicate a propensity towards a helical structure, no contacts indicative of a defined secondary structure could be detected by 2D NOESY experiments with mixing times up to 250 ms, as shown in Fig. 3.6B. Our CD and NMR results indicate that the peptide, despite adopting an alpha helical conformation in strong surfactants such as SDS or DPC and displaying a helical propensity in bicelles, does not adopt a defined conformation when bound to these model membranes.

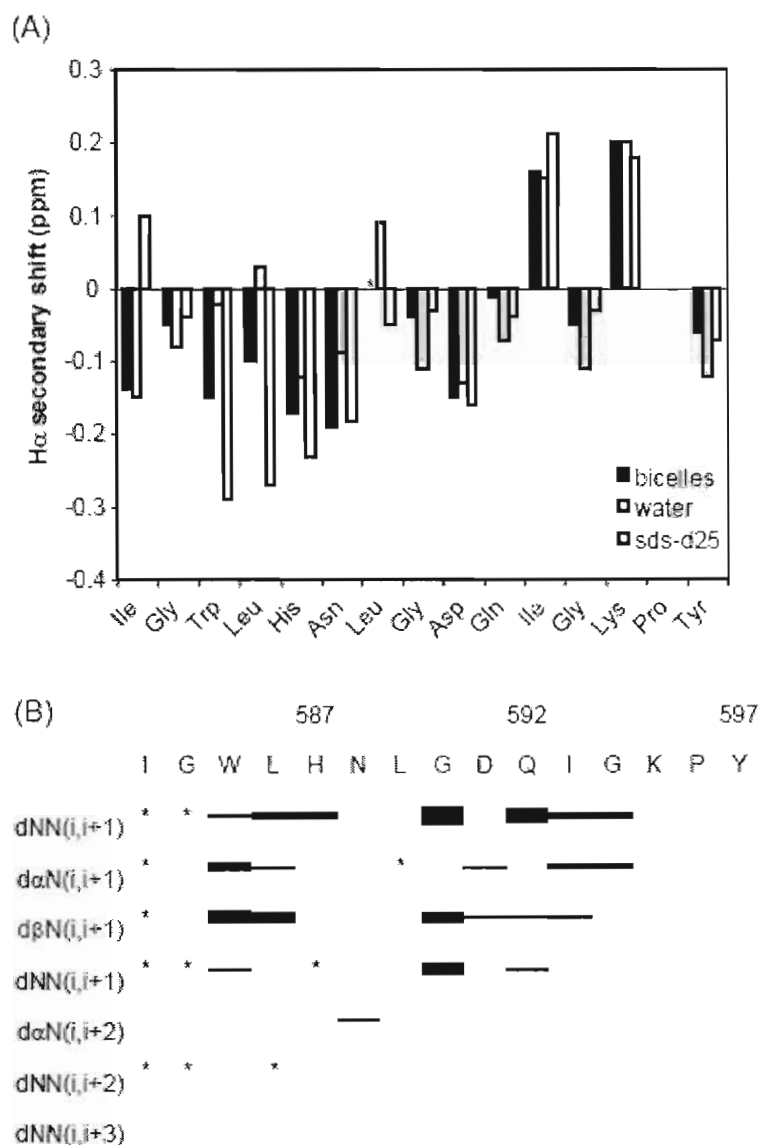


Figure 3.6: (A) $^1\text{H}_\alpha$ secondary chemical shifts from random coil values for hERG (583-597) in H_2O at pH 5.5 (grey), bicelles (black) with $q=1$ and SDS- d_{25} (white). Unassigned residues are marked with an asterisk. (B) Table of contacts for hERG (583-797) in bicelles ($q=1$) obtained by NOESY with a mixing time of 250 ms. The width of the bars are proportional to cross peak intensities.

3.4.2 Interaction of cardiotoxic drugs with $\text{I}^{583}\text{-Y}^{597}$ and model membranes

Previous work has demonstrated that drugs such as dofetilide and vesnarinone can induce LQTS by binding sites on the S5-P extracellular loop of the hERG

channel [10, 50]. Therefore, we have investigated the potential role of the central segment I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ in the ALQTS by investigating the association of four drugs with known LQTS activity. The structure and logP of bepridil, cetirizine, diphenhydramine and pentamidine are shown in Table 1.2 (chapter 1).

We have first verified the binding affinity of the cardiotoxic drugs with the hERG loop segment by self-diffusion measurements using by ¹H NMR PFGSTE experiments. As described in a previous section, this method can be used to detect a binding between LQTS-labile drugs and the hERG segment studied in this work. Table 3.1 displays the diffusion coefficients of the drugs, the hERG peptide and one drug, diphenhydramine, in the presence of the peptide. As can be seen on this Table, the percentages of drugs associated to I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ segment vary as follow: bepridil (18%) > pentamidine (15%) > cetirizine (13%) > diphenhydramine (8%). Note that these experiments were conducted at a drug:peptide ratio of 1:1 in order to force the potential interaction between the two. We can therefore conclude that the binding of the four studied drugs to segment I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ is negligible.

The hERG channel is located in the cardiomyocyte membranes where the hydrophobic environment provides the adequate environment to allow protein movement following gating of the channel [103]. Amphiphilic drugs such as anesthetics are, however, known to affect cell function by inserting in the membrane bilayer [105]. Considering the weak affinity for the extracellular I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ of the cardiotoxic drugs studied in this work as well as their amphiphilic nature, we have investigated their possible interaction with model membranes.

As previously described in this article for segment I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷, translational diffusion measurements in the presence of isotropic bicelles (q=0.5) have been carried out to address this question. As shown in Table 3.1, the affinity of these drugs for the lipid bilayer is strong, the fraction of bound molecules varying between 97% and 100%. Consequently, these drugs display a significantly higher affinity for the membrane than for the hERG segment studied in this work.

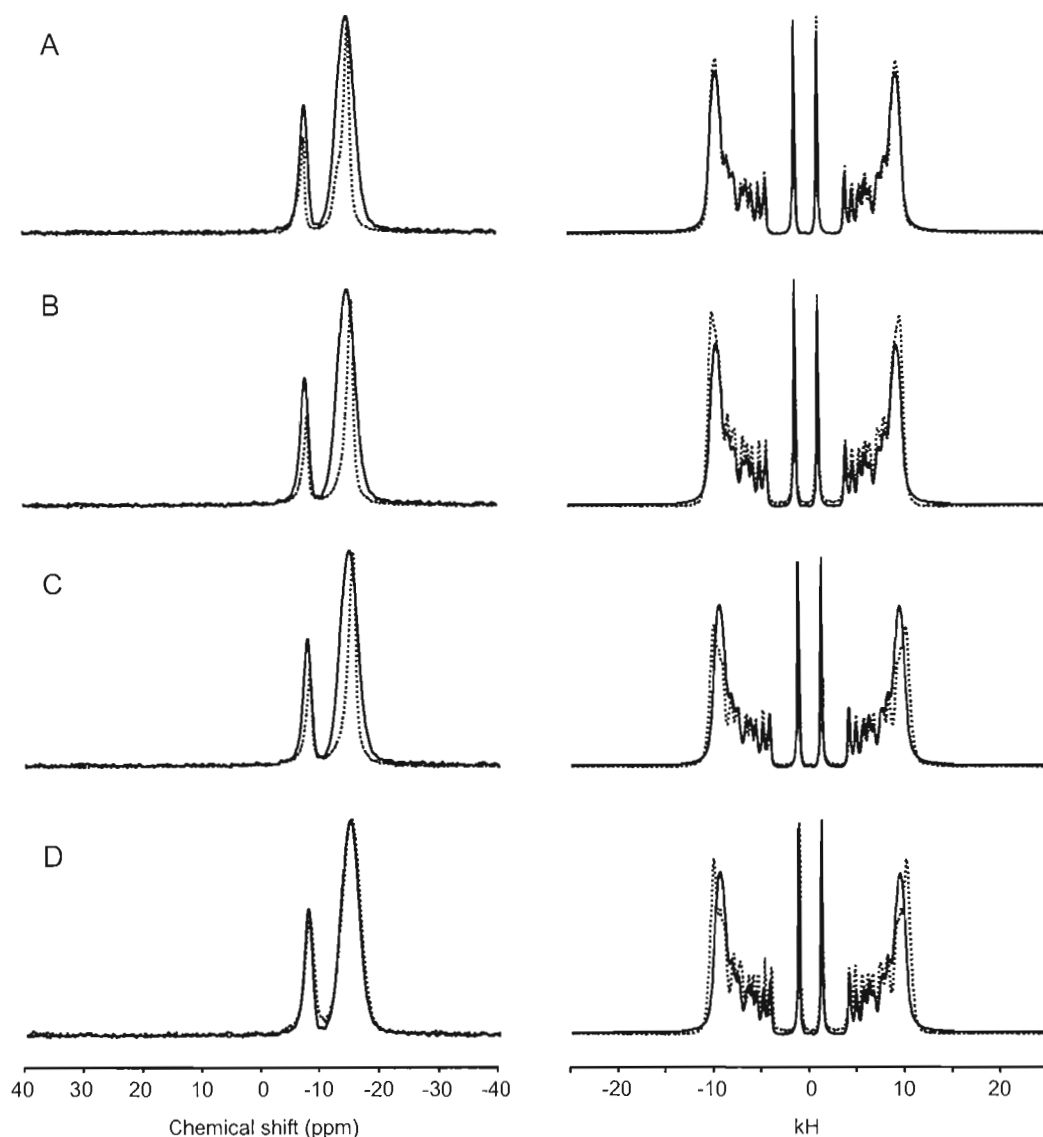


Figure 3.7: ^{31}P (left) and ^2H (right) ssNMR spectra of DMPC/DHPC bicelles ($q=3.5$) at 37°C in the presence of A) pentamidine, B) diphenhydramine, C) cetirizine and D) bepridil (dotted lines) with a drug to lipid ratio (100:1). The reference spectra of bicelles is superposed for comparison (solid line).

The ^{31}P and ^2H SS-NMR techniques previously described were used to further investigate the interaction of the cardiotoxics with the bicelles. As seen in Fig. 3.7 on the ^{31}P NMR spectra, cetirizine, diphenhydramine and pentamidine reduce the mosaic spread of the bicelle orientation in the magnetic field [98]. In addition,

resonances of both DMPC and DHPC are shifted upfield when diphenhydramine and pentamidine are added to the bicelles. This could be explained by changes in the phospholipid headgroup dynamics [106]. The bicelle structure is however maintained. The ^2H NMR spectra presented in Fig. 3.7 for bicelles in the presence of the drugs are typical of well-oriented objects. Examination of the quadrupolar splittings of DMPC- d_{54} shows an increase of 7% in the plateau region when bepridil and cetirizine are added to the bicelles, and of 4% with diphenhydramine. No effect is induced by the presence of pentamidine. Altogether, the SS-NMR data suggest that bepridil, cetirizine and diphenhydramine would insert in the hydrophobic core of the membrane and induce some ordering of the lipid acyl chains. On the other hand, pentamidine would have more affinity for the headgroup region. These results are consistent with the logP values of the molecules.

This drug affinity for the membrane does not rule out the possibility of an increased binding of the drug to the peptide when the latter interacts with the membrane. As shown in previous sections of this work, the structure of the peptide can be altered in the presence of the membrane and an eventual membrane-induced difference in drug peptide interaction needs to be addressed. For this purpose, diffusion measurements were carried out when the $\text{I}^{583}\text{-Y}^{597}$ segment is incorporated into isotropic bicelles. We chose to examine the drug which showed the weakest binding to the free peptide and the less likely insertion in the hydrophobic core of the bilayer, namely diphenhydramine.

As revealed in Table 3.1, a minor increase of the drug binding to the bicelles is measured when the hERG segment is present, the fraction of bound diphenhydramine increasing from 96% to 98%. However, this is within the experimental error, and the strong binding of diphenhydramine can not be ascribed to the actual presence of the $\text{I}^{583}\text{-Y}^{597}$ segment. Therefore, we have performed STD experiments in order to verify any direct interaction of the drug with the hERG segment in the model membrane. This was done by saturating specific amino acid resonances and monitoring the saturation transferred to the drug signals. These experiments are known to enable the detection of transient binding of small ligands

(i.e. cardiotoxic drugs) to macromolecular receptors (i.e. hERG peptide in bicelles) [35, 36]. No saturation transfer to diphenhydramine could be detected when amide or aromatic protons from the peptide residues were saturated (data not shown). In consequence, no membrane-induced direct interaction between the I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ segment and diphenhydramine could be identified.

3.5 Discussion

Efforts have been invested over the past five years to help refining the structural model of the hERG channel which is mostly predicted from homology with other voltage-gated K⁺ channels. Electrophysiology and NMR data provided a better insight on different hERG moieties such as the N- and C-terminals, S4, S5 and the extracellular pore loop that links S5 to the pore helix [57, 59, 107-111]. The dynamical nature of this segment has been ascertained, and its location in proximity of the membrane surface motivates the study of an interaction. In addition, the binding of drugs to the S5-P loop could trigger long QT effect in the heart. Therefore, the goals of this work were to study the interaction of the I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ central segment of the hERG S5-P loop with model phospholipid membranes, and to investigate its potential role in ALQTS.

Bicelles were used as model membranes because they are amenable to both liquid-and solid-state NMR. In addition, their composition and morphology provide a good mimic of natural membranes. Lipids are determinants for channel function and their composition greatly influences membrane structural and physical properties, such as curvature and fluidity that are involved in the regulation of the gating of K⁺ channels [102, 112, 113]. Mammalian plasma membranes are composed of diverse lipids comprising cholesterol, sphingolipids and phospholipids, with phosphatidylcholines the most abundant [114]. Furthermore, phospholipids are not symmetrically distributed within the bilayer of the plasma membrane. Zwitterionic phosphatidylcholines are more concentrated in the outer leaflet while negatively-charged phosphatidylserines are found in the inner leaflet [103]. This further explains the choice of a zwitterionic DMPC/DHPC bicellar system for our NMR work.

The combination of liquid-and solid-state NMR experiments showed that the studied hERG segment interacts strongly with the membrane where it would most likely lie on the surface. This interaction perturbs the lipid headgroups dynamics and increases the acyl chain mobility close to the interface. The bilayer integrity is however preserved. The interaction of the I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ peptide with the model membrane is consistent with a “floppy” outer mouth, as proposed by Liu et al. [14]. Based on secondary structure analyses and cysteine-scanning mutagenesis, they demonstrated that the conformational flexibility of the outer mouth plays a key role in the hERG channel function. This flexibility and significant length of the S5-P linker could allow it to reach the membrane surface where its strong affinity might allow the stabilization of certain channel conformations during the gating process [45].

We have then determined the structure of I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ in zwitterionic bicelles. This step was important as previous NMR studies were performed in detergent (SDS and DPC) micelles [57, 59]. Our multidimensional ¹H NMR experiments and chemical shift analysis indicate that the I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ segment shows no define secondary structure. These findings are confirmed by CD spectroscopy which also shows that the hERG linker segment is unstructured in water while it is structured in most of the detergents used in membrane structure determination, including SDS [100, 115]. It thus appears that the membrane environment strongly influences the structure of this hERG loop segment.

Interestingly, the CD spectra of negatively-charged bicelles containing 25% and 50 mol% of PS display the characteristic signals of an α -helical structure, and the helical content increases with surface charge. It is thus clear that the charge of the model membrane has an effect on the I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ structure. The membrane potential in the cardiomyocytes changes rapidly during the gating process. Therefore, according to our results, we can hypothesize that this rapid change in surface charge could possibly result in a modification of the conformation of the extracellular segment (I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷) of the hERG channel.

We believe that the apparent contradiction between the structure of the peptide in DMPC bilayers or in surfactant micelles might be of functional importance. Torres *et*

al. [59] and Jiang *et al.* [57] have shown, using electrophysiology experiments, that the S5-P linker interacts with other parts of the channel. It is thus possible that hydrophobic regions of the hERG channel might provide an additional driving force that would enable the structuring of the region from W⁵⁸⁵ to I⁵⁹³, the segment that has been shown to adopt an alpha helical conformation in SDS or DPC micelles [57, 59]. According to our results, an interaction with the membrane bilayer would not be sufficient for this segment to adopt a helical structure. Thus, should the functional structure of W⁵⁸⁵-I⁵⁹³ actually be an alpha-helix, it would result from protein-protein interactions rather than protein-membrane interactions. For lack of structural data on the complete hERG pore in a membrane milieu, the question of the *in vivo* structure of segment I⁵⁸³-I⁵⁹³ remains open.

Considering the structural flexibility of the S5-P linker, a model in which segment I⁵⁸³-I⁵⁹³ would bind competitively (or at different stages of the gating process) to other parts of the pore channel or the membrane can be hypothesized. The concomitant structural changes could provide additional conformational flexibility to the outer mouth region. This is consistent with the role of the extracellular pore loops in the pore domain of ion channels, i.e. to provide architectural versatility [45].

The results obtained by ¹H NMR diffusion experiments show that the four hERG-active drugs studied in this work have a weak affinity for the I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ segment. The experiments were done at a drug/peptide molar ratio of 1:1, well above what could be expected biologically. This segment would, thus, most likely not be targeted by bepridil, cetirizine, diphenhydramine and pentamidine in the ALQTS mechanism. Previous studies on bepridil suggest that this antiangine medicine would bind sites close to the pore helix (Thr⁶²³, Ser⁶²⁴, and Val⁶²⁵) and Phe⁶⁵⁶ on S6. However, these drugs showed a marked affinity for the membrane environment of the hERG channel. It is thus conceivable that the partition of these drugs in the membrane could change its local properties, thus affecting the channel function. For example, voltage-gated K⁺ channels such as the Shaker are known to be mechanosensitive and can respond to membrane stretch [103]. Therefore the movement of VGK channels during the gating can be altered by the lipid-protein interface [103]. Studies

have shown that the conformation of channels such as the MscL can be changed by deformation of the lipid bilayer [116]. The lipid annulus composition around membrane proteins such as ion channels plays a role in its conformation and could be involved in triggering events [113]. Therefore, perturbation of this annular shell by drugs is a possible drug action mechanism as suspected with anaesthetics [117]. A similar mechanism of action has been evidenced with the voltage-sensor toxin VsTx1 with the Kv2.1 channel [118]. Finally, the QT prolongation induced by these drugs would most likely be explained by a preference for other binding sites on other hERG domains. They could, for example, traverse the membrane to access putative LQTS-provoking target residues which lie in the cytosolic (intracellular) parts of the hERG channel, as was observed for tetracaine which interaction with membrane lipids enhanced its access to the transmembrane pore [119]. Therefore, our drug-membrane interaction results open the possibility of a membrane catalysis model for drugs involved in the ALQTS, as can be observed for receptor ligands [120].

3.6 Conclusion

Using a liquid- and solid-state NMR approach, we have shown that extracellular S5-P linker segment I⁵⁸³-Y⁵⁹⁷ of the hERG channel strongly interacts with model PC membranes where it would rest in the polar region. This segment does not adopt a well-defined secondary structure despite its strong interaction with this specific membrane bilayer, as confirmed by circular dichroism analysis. Its conformation, however, was shown to vary as a function of the membrane nature and charge, thus proving its strong structural flexibility. These results show that the membrane is likely to play an important role in hERG channel functioning, possibly by stabilizing transient conformations during the gating process. The interaction with this hERG segment of four cardiotoxic drugs, namely bepridil, cetirizine, diphenhydramine and pentamidine, was shown to be negligible. However, these drugs proved to have a strong affinity for the membrane, thus opening the possibility for a membrane-mediated ALQTS mechanism or membrane catalysis.

CHAPITRE IV

Expression et purification du segment Gly⁵⁴⁶ – Leu⁶⁰² du canal hERG

4.1 Introduction

Pour effectuer des analyses de RMN, il est nécessaire de posséder des quantités de l'ordre du milligramme de la protéine membranaire d'intérêt. De plus, afin de pouvoir déterminer sa structure, il est essentiel de pouvoir la marquer avec des isotopes tels que le ¹⁵N et le ¹³C. Pour ce faire, il est possible de synthétiser chimiquement le polypeptide mais cette méthode se limite à une séquence variant entre 25 et 50 acides aminés (a.a) en raison de l'accumulation de produits secondaires qui se forment après le couplage répété des a.a. et en raison de la complexité de la méthode pour obtenir des grandes quantités de peptides [121]. Cette limitation au niveau de la méthode synthétique a motivé les chercheurs à développer d'autres moyens d'expression tels que l'utilisation de bactéries ou tout récemment, le système d'expression sans cellule pour produire des milligrammes de protéines membranaires marquées au ¹⁵N et/ou au ¹³C [122].

L'utilisation de bactéries telles que *Escherichia coli* comme système d'expression hétérologue représente une technique de choix qui est d'ailleurs considérée comme un excellent système d'expression pour produire des quantités adéquates (variant entre 1 mg et plusieurs dizaines de mg par litre de culture) de protéines membranaires marquées au ¹⁵N et/ou au ¹³C pour les raisons suivantes [123]. En effet, *E. coli* est utilisée comme organisme d'expression hétérologue depuis de nombreuses années. Ainsi, une grande variété de vecteurs d'expression et de souches bactériennes permettant un contrôle efficace de la production protéique sont disponibles. Pour la plupart des souches, les gènes codant pour des protéases ont été mutés visant ainsi à réduire le niveau de dégradation de la protéine recombinante dans la bactérie. Cela permet donc l'obtention de haut

rendement de protéines. De plus, contrairement aux systèmes d'expression impliquant des insectes, des levures ou des cellules mammifères, *E. coli* est beaucoup plus simple à utiliser, moins coûteux et beaucoup plus rapide à produire à grande échelle. Finalement, même si le marquage isotopique des protéines membranaires a été démontré avec d'autres systèmes d'expression, aucun d'entre eux ne peut permettre un marquage aussi facile et peu coûteux qu'avec *E. coli*. Il suffit de lui fournir un milieu de culture enrichi en isotopes (ex. milieu M9 avec du $^{15}\text{N}-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et/ou du ^{13}C -glucose comme seule source d'azote et/ou de carbone) pour obtenir à grande échelle notre protéine membranaire d'intérêt totalement marquée avec le ou les isotopes choisis. En ce qui concerne les autres systèmes d'expression, la complexité du milieu de culture nécessaire à la croissance de même que les conditions de culture plus limitées font en sorte que ces systèmes sont plus coûteux et nécessitent plus d'attention (donc plus de temps).

Afin d'augmenter la solubilité de la protéine membranaire exprimée et/ou afin de pouvoir la purifier, une stratégie intéressante consiste à la faire exprimer avec un partenaire de fusion. C'est d'ailleurs cette stratégie qui fut exploitée dans le cadre du présent travail. Pour ce faire, on insère dans le vecteur choisi la séquence du partenaire de fusion devant celle de la protéine d'intérêt. Le partenaire de fusion peut être une autre protéine solubilisante jumelée à un tag de purification ou simplement le tag de purification tout seul. Les protéines solubilisantes sont en général des polypeptides de grande taille comme par exemple la *Maltose Binding Protein* (MBP) possédant un poids moléculaire de 40 kDa, la thiorédoxine (Trx) qui fait 11,7 kDa ou la protéine *Nus A* provenant d'*E. coli* qui fait 55 kDa [121]. La fonction solubilisante de ces protéines a été constatée expérimentalement et n'est pas nécessairement comprise [121, 124]. Cette fonction reposerait sur la capacité de la protéine solubilisante à interagir avec la protéine d'intérêt afin de permettre la stabilisation de sa structure ou de masquer des domaines hydrophobes exposés permettant ainsi de maintenir la protéine sous une forme soluble dans la bactérie. Les tags de purification les plus utilisés sont les His-tags qui sont formés d'une séquence variant entre 6 et 10 histidines. La purification des protéines portant ce tag

se fait par chromatographie d'affinité grâce à des billes d'agarose ou de sépharose couplées à des atomes de nickel. Il importe également d'inclure entre la séquence du partenaire de fusion et celle de la protéine d'intérêt un site de clivage spécifique (ex. Factor Xa) qui va permettre de se débarrasser du partenaire de fusion après la purification. Les His-tags (en raison de leur petite taille) affectent moins la structure des protéines recombinantes que les tags plus gros (tel que la Glutathione-S-Transférase, aussi couramment employée) [125]. Pour cette raison, ils ne sont généralement pas clivés avant les analyses par RMN. Il est cependant essentiel de se débarrasser du partenaire solubilisant avant d'entreprendre toute analyse par RMN, puisque la fonction de cette protéine pourrait impliquer une interaction avec la protéine d'intérêt et une modification de sa structure ou de sa mobilité.

D'autres méthodes de purification peuvent suivre la purification initiale, telles que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), la chromatographie par échange d'ions (IEC), etc. Ces techniques peuvent s'avérer nécessaires lorsque le produit résultant de la purification par chromatographie d'affinité n'est pas assez pur (ex. présence de protéines non désirables d'*E. coli* ayant une affinité pour les billes d'agarose-nickel) ou afin de séparer l'enzyme de clivage de la protéine d'intérêt lorsque la séparation du partenaire de fusion se fait par clivage enzymatique.

Bien que l'utilisation d'*E. coli* comme système d'expression soit très efficace, il n'est pas parfait. En effet, étant donné que la plupart des protéines recombinantes sont produites dans le cytoplasme de la bactérie, (surtout lorsqu'elles sont exprimées avec un partenaire de fusion) l'expression de peptides ou protéines membranaires peut être problématique. Un des problèmes pouvant survenir avec l'utilisation de ce système est celui du repliement des protéines membranaires qui risquent de former des agrégats dans l'environnement hydrophile à l'intérieur de la bactérie [123]. Ce problème peut engendrer des difficultés durant l'étape de purification. De plus, en raison de toute l'optimisation entourant un tel système, il est

nécessaire de prévoir plusieurs jours voire plusieurs semaines avant d'obtenir un produit assez pur et en quantité suffisante pour pouvoir l'étudier par RMN.

Afin de contourner toutes les longues étapes dans le système d'expression par *E. coli* (ex. transformation bactérienne, culture, optimisation), des chercheurs ont créé un nouvel outil: le système d'expression sans cellule (figure 4.1). Ce système disponible commercialement depuis déjà quelques années est assez coûteux mais extrêmement rapide et efficace. En effet, il est maintenant possible d'obtenir plusieurs milligrammes de protéines en seulement quelques heures. Les kits commerciaux contiennent la machinerie cellulaire requise pour permettre la transcription et la traduction de la protéine d'intérêt. Ils sont également munis d'un module d'acides aminés et d'un système pour la régénération de l'ATP. Au fur et à mesure que la matrice d'ADN est transcrite, l'extrémité 5' de l'ARNm se lie aux ribosomes où elle subit ensuite le processus de traduction tandis que l'extrémité 3' subit toujours le processus de transcription. Ce système commence à gagner en popularité et si son prix arrive à diminuer considérablement, il ne serait pas surprenant que l'utilisation de ce système d'expression détrône celui d'*E. coli* pour le titre du système le plus utilisé dans la production de protéines membranaires pour l'étude par RMN.

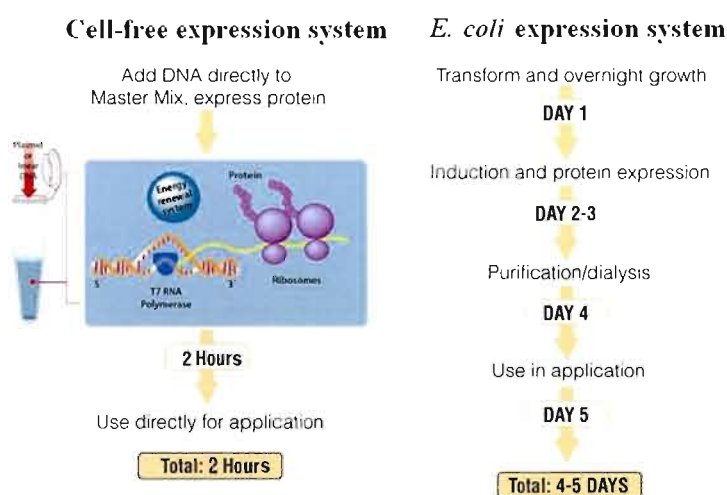


Figure 4.1 : Système d'expression sans cellule comparé au système d'expression *E. coli*. Image modifiée à partir du site web de la compagnie Promega.

4.2 Stratégie

Dans le cadre du présent projet, le système d'expression d'*E. coli* fut utilisé. Des bactéries furent transformées afin qu'elles produisent les segments S5 et S6 du canal à potassium hERG pour ensuite extraire et purifier ces segments pour une étude ultérieure par RMN visant à vérifier les sites d'interactions de médicaments cardiotoxiques avec ces parties du canal. Pour ce faire, des bactéries *E. coli DH5 α* ont d'abord été transformées avec le plasmide hERG1apcDNA3 fourni par G. A. Robertson (University of Wisconsin). Ce dernier a une taille de 9337pb et contient le gène hERG codant pour le canal à potassium hERG humain exprimé principalement dans les cellules cardiaques. Il s'agit d'un plasmide à faible nombre de copies contenant un gène de résistance à l'ampicilline qui permet la sélection des bactéries transformantes. Une fois cette première transformation effectuée, le plasmide hERG1apcDNA3 fut purifié avant d'être utilisé pour amplifier par PCR (réactions de polymérisations en chaîne) les régions du gène hERG codant pour les parties S5 et S6. Les PCRs furent effectuées avec un appareil Mastercycler® gradient thermal cycler, 115 V/50 Hz-60 Hz de la compagnie Eppendorf™ dans un volume final de réaction de 20 μ l. Le tableau suivant présente les conditions ayant permis d'amplifier l'ADN codant pour les segments S5 et S6 tandis que le Tableau 4.2 présente le contenu du mélange à PCR.

Tableau 4.1 : Programme ayant servi à l'amplification du segment d'ADN codant pour la partie S5 et S6 du canal hERG.

Segment S5			Segment S6		
Température (°C)	Temps		Température (°C)	Temps	
94	1 min.		94	1 min.	
94	40 sec.	5X	94	40 sec	15X
55	1 min.		43 - 52	1 min.	
68	45 sec.		68	45 sec.	
94	40 sec.	10x	94	40 sec	15x
56+1 degré/ cycle	1 min		65	1 min.	
68	45 sec.		68	45 sec	
94	40 sec.	15X	68	5 min.	
65	1 min.				
68	45 sec.				
68	7 min.				

Tableau 4.2 : Contenu du mélange à PCR utilisé pour amplifier les segments d'ADN d'intérêts. *dNTP= mélange des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) utilisés au cours d'une PCR; Taq HiFi = ADN polymérase.*

Ingrédients	Quantité
10X tampon PCR	2 µL
10mM dNTP	0,5 µL
50mM MgSO ₄	0,8 µL
Amorce sens	0,4 µM final
Amorce anti-sens	0,4 µM final
ADN	20 ng
Taq HiFi	0,2 µL

Des amorces sens et anti-sens spécifiques aux régions codantes pour chacun de ces 2 segments furent utilisées. Ces amorces furent produites par la compagnie Alpha DNA, Montréal, Québec. La figure 4.2 démontre bien la stratégie employée pour le choix des amorces.

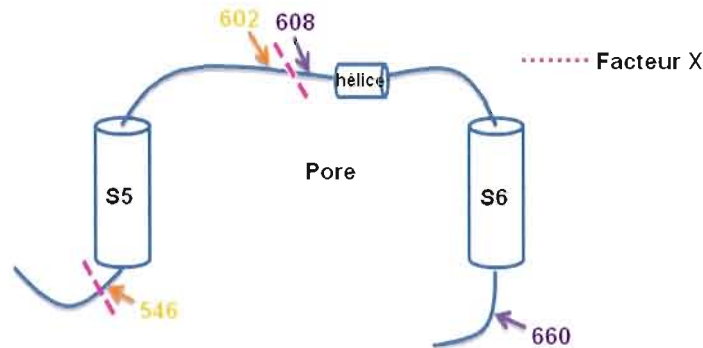


Figure 4.2 : Partie S5 et S6 du canal hERG avec sites de coupures enzymatiques pour les obtenir séparément. Le choix des amorces est essentiel au succès de la PCR. Ce sont les amorces qui vont permettre d'amplifier la région d'intérêt d'une séquence donnée. La figure ci-dessus présente les sites de coupures par l'enzyme *facteur X*. La séquence de chacune des amorces est également présentée plus bas. Ces sites de coupures ont été ajoutés afin de pouvoir séparer les segments S5 et S6 de leur His-tag une fois l'extraction terminée. De plus, une lysine a été ajoutée toujours dans cette même amorce, après le site de coupure *facteur X*, afin de s'assurer qu'on ait bien toute la partie transmembranaire une fois la coupure effectuée. Si on désire exprimer S5, on utilise les amorces 546F et 602R ; si on désire exprimer S6, on utilise les amorces 608F et 660R ; si on désire exprimer le pore entier de S5 à S6, on utilise les amorces 546F et 660R.

Pour le segment S5

Sens : 546F

GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCA ATC GAT GGG CGT AAA GGC GCG GCC GTG CTG TTC

Gateway Facteur X lys 546 - 551

Anti-sens : 602R

GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA TTA CAG GCC GCT GCT GTT GTA G

Gateway stop 602 - 597

Pour le segment S6

Sens : 608F

GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTG ATC GAT GGG CGT AAG GAC AAG TAT GTG ACG

Gateway Factor X 608-613

Anti-sens : 660R

GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA TTA CGA CAC GTT GCC GAA GAT

Gateway stop 660 - 655

Les produits du PCR ont ensuite servi au clonage par recombinaison dans des plasmides selon la méthode Gateway®. Cette technique est commercialisée par la compagnie Invitrogen™ et repose sur la recombinaison spécifique de site du bactériophage λ et qui a été optimisée pour que son efficacité soit tout près de 100%. La figure ci-dessous explique bien le principe de cette récente technologie.

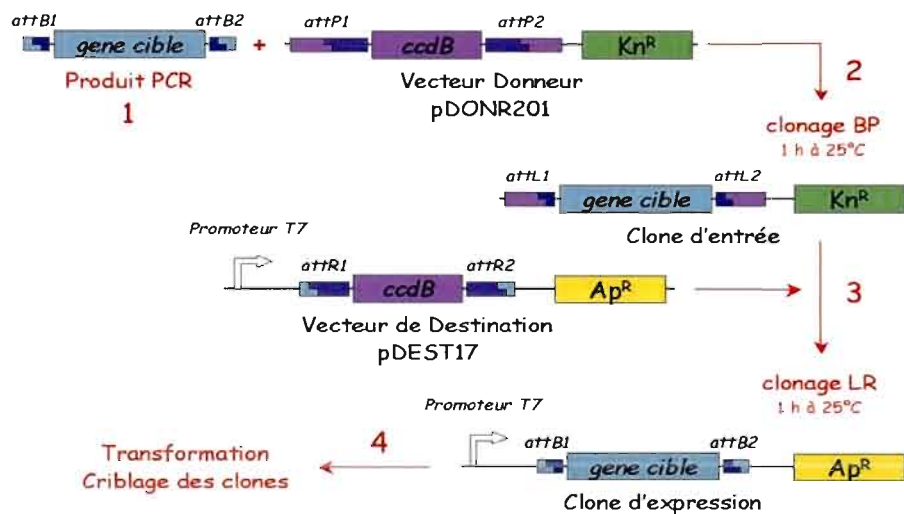


Figure 4.3 : Technologie Gateway®. (1) Amplification du gène cible (bleu) par PCR à l'aide d'une amorce sens qui contient la séquence spécifique de recombinaison attB1, et d'une amorce anti-sens qui contient la séquence attB2. Ces séquences attB1 et attB2 (25 bases chacune) sont ensuite fusionnées aux extrémités 5' et 3' du

gène cible. (2) Ce produit PCR est ensuite sous-cloné dans le vecteur pDONR201 en présence de la BP clonase qui catalyse la recombinaison entre les sites attB et attP. (3) Le produit de cette première étape peut être isolé pour d'autres clonages (après transformation et sélection sur milieu kanamycine (vert) ou, tel que démontré ci-haut, peut être incubé directement sans aucune étape de purification avec le vecteur pDEST17, en présence de la LR clonase qui catalyse la recombinaison entre les sites attL et attR. (4) Le produit résultant de cette dernière étape est utilisé pour transformer les bactéries, puis les colonies transformées sont sélectionnées sur plaque d'agar contenant de l'ampicilline (jaune). Le criblage de seulement deux transformants est suffisant pour obtenir le vecteur final. Cette grande efficacité est due à l'utilisation couplée d'une sélection négative (présence d'un gène toxique dans le vecteur vide, *ccdB* (mauve) qui provoque la mort des bactéries transformées par ce vecteur) et d'une sélection positive des vecteurs recombinants portant un gène résistant aux antibiotiques.

Dans le cadre du présent projet, le vecteur donneur utilisé pour la réaction BP, fut le vecteur pDONR201, tel qu'indiqué dans la figure 4.3. Pour la réaction LR, le vecteur de destination pDEST17 fut employé en plus de cinq autres vecteurs. Le tableau 4.3 présente les différentes caractéristiques de chacun des vecteurs de destination utilisés.

Tableau 4.3 : Caractéristiques de chacun des six vecteurs de destination utilisés lors de la réaction LR pour la transformation par la méthode Gateway.

Nom	Promoteur	Tag	Taille du tag (kDa)
pDEST17	T7	His 6	2,3
pDEST-544	T7	His 6-Nus	56,7
pDEST-545	T7	His 9-Nus	57
pDEST-546	T7	His 6-Trx	16,8
pDEST-566	T7	His 6-MBP	42,9
pDEST-567	T7	MBP-His 6	43,2

Des bactéries de souche *Rosetta* furent ensuite transformées avec les nouveaux plasmides pDEST. Cette souche particulière de bactéries permet

d'augmenter le taux d'expression de protéines eucaryotes contenant des codons rarement utilisés dans *E. coli*. En effet, cette souche bactérienne contient un plasmide avec un gène de résistance au chloramphénicol et les ARNt de six codons fréquemment utilisés chez l'humain soit AUA, AGG, AGA, CUA, CCC et GGA. De plus, elles sont protéases négatives (déficiante en *lon* et *ompT*), ce qui augmente grandement la stabilité des protéines recombinantes produites.

Les protéines recombinantes furent alors extraites par lyse bactérienne chimique (processus visant à détruire les membranes bactériennes avec des lysozymes dans le but de récolter le contenu du cytoplasme) en présence d'inhibiteurs de protéases (apoprotin, leupeptin et phenylmethanesulfonylfluoride) puis purifiées à l'aide de billes d'affinité. Ces dernières sont des billes d'agarose d'un diamètre de 1 μm permettant d'isoler les protéines avec His-tag. Chaque bille est couplée à un atome de nickel (agent chélateur) par l'entremise de quatre des six sites de coordination de cet atome. L'anneau imidazole des résidus histidines (His) présent dans une chaîne peptidique poly-His est en mesure de venir occuper les deux sites de coordination restants, ce qui résulte en la fixation de l'His-tag de la protéine tel que montré à la figure 4.4.

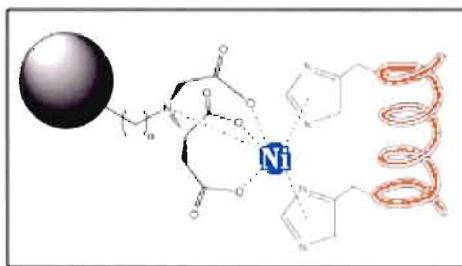


Figure 4.4 : Bille d'agarose couplée à un atome de nickel servant à la purification de protéine portant l'His-tag grâce aux anneaux imidazoles des histidines.

4.3 Résultats

Les fragments S5 et S6 ont été clonés dans des vecteurs d'entrée puis dans des vecteurs d'expression en bactérie. Afin de simplifier cette section, seulement les résultats de S5 seront présentés.

La première étape du projet consistait à insérer le plasmide hERG1apcDNA3 dans des bactéries *E. coli* DH5 α . Même si les bactéries transformées furent sélectionnées sur un milieu contenant de l'ampicilline, on a voulu s'assurer qu'elles possédaient effectivement le bon plasmide avant de continuer. Pour s'assurer que nous avons bien amplifié le plasmide hERG1apcDNA3, nous avons digéré la construction grâce à des enzymes de restriction. Nous avons sélectionné une enzyme qui coupait à deux endroits seulement et qui donnait deux fragments de tailles différentes. L'enzyme choisie fut la *Xho*I qui coupe à 3008pb dans le gène hERG et à 4862pb dans le vecteur. Les fragments résultant de ces coupures mesurent respectivement 1854pb et 7483pb.

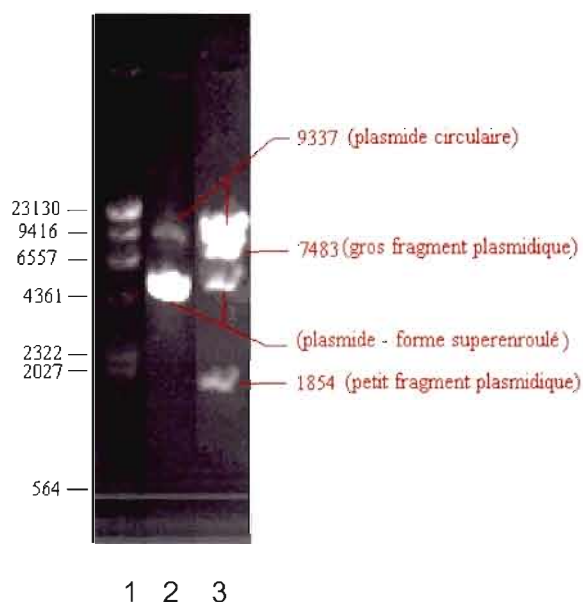


Figure 4.5 : Analyse de la digestion de hERG1apcDNA3 par *Xho*I par électrophorèse en gel d'agarose 0,8%. (1) Échelle de poids moléculaire (affichée en paire de bases) obtenue par la digestion du phage lambda par l'enzyme *Hind*III. (2)

Plasmide non-digéré. On remarque l'ADN circulaire qui migre moins rapidement et l'ADN superenroulé qui migre beaucoup plus vite. (3) Plasmide digéré par *Xho1*. On remarque l'ADN circulaire et l'ADN superenroulé qui n'ont pas été digérés et on peut voir les deux fragments d'ADN résultant de la digestion enzymatique (à 7483pb et à 1854pb).

La deuxième étape du projet consistait à amplifier par PCR les séquences d'intérêt S5 et S6 à l'aide des amorces présentées plus haut. La figure 4.6 prouve que la région d'intérêt de la partie S5 a été amplifiée. La bande observée à 250pb dans le puits 1 correspond à cet amplicon.

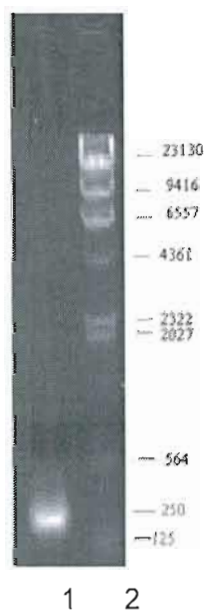


Figure 4.6 : Résultats de la migration de l'ADN obtenus par PCR sur gel d'agarose 0,8%. (1) ADN amplifié par PCR contenant la partie S5 du canal hERG (2) Échelle (affichée en paire de bases) obtenue par la digestion du phage lambda par l'enzyme *HindIII*.

Cet ADN amplifié par PCR a ensuite été précipité au PEG8000/30mM $MgCl_2$ afin d'éliminer les sels, nucléotides, oligonucléotides et polymérases contenus dans le mélange de PCR. Une nouvelle migration sur gel fut effectuée après le traitement pour estimer la quantité d'ADN restant (figure 4.7). En connaissant la quantité d'ADN (0,2 $\mu g/\mu l$) utilisée pour l'échelle de poids moléculaire (puits 1, figure 4.7) et en

comparant l'intensité de ces bandes avec notre bande dans le puits 2, il a été possible d'estimer la quantité d'ADN à 190 ng/μl.



Figure 4.7 : Résultats de la migration de l'ADN obtenu après traitement au PEG 30% sur un gel d'agarose 0,8%. (1) Échelle obtenue par la digestion du phage lambda par l'enzyme *HindIII*. (2) ADN contenant la partie S5 du canal hERG amplifiée par PCR et traitée au PEG 30% pour éliminer les impuretés.

Une fois le produit PCR quantifié, la prochaine étape consistait à le recombiner dans le vecteur donneur pDONR201 grâce à la BP clonase. Le produit de recombinaison fut transformé dans des bactéries DH5α. Les transformants furent sélectionnés sur milieu contenant de la kanamycine, et le plasmide contenu dans ces bactéries fut purifié par chromatographie échangeuse d'ions (kit Qiagen, miniprep). La figure 4.8 montre les résultats de la migration du vecteur purifié. La quantité d'ADN de ce dernier fut estimée à 55 ng/μl. Les vecteurs pDONR201-S5 et pDONR201-S6 furent ensuite séquencés par la plateforme génomique de l'Université McGill afin de s'assurer qu'il n'y avait pas eu de mutation induite par l'amplification PCR des fragments S5 et S6 avant d'entreprendre l'étape suivante. Les deux vecteurs possédaient la bonne séquence (données non présentées).

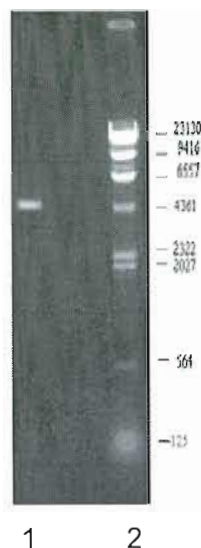


Figure 4.8. Résultats de la migration de l'ADN du clone d'entrée extrait et purifié des bactéries *E. coli DH5α* ayant subi une transformation avec le plasmide pDONR201 recombiné avec le produit PCR S5 sur un gel d'agarose 0,8%. (1) ADN plasmidique de pDONR201 recombiné avec le produit PCR du segment S5. (2) Échelle (affichée en paire de bases) obtenue par la digestion du phage lambda par l'enzyme *HindIII*.

L'étape suivant la quantification du clone d'entrée consistait à recombiner ce dernier dans chacun des six vecteurs de destination grâce à la recombinaison LR (tableau 4.3). Les produits de recombinaison sont ensuite transformés dans les bactéries DH5α et les transformants choisis sur milieu sélectif contenant de l'ampicilline. Nous avons ensuite vérifié que les colonies sélectionnées contenaient bien les vecteurs présentant les séquences S5 ou S6. Pour ce faire, nous avons effectué des PCRs sur les bactéries avec les amorces 546F - 602R pour le segment S5 et 608F - 660R pour S6. La figure 4.9 présente les résultats obtenus après la PCR pour le segment S5.

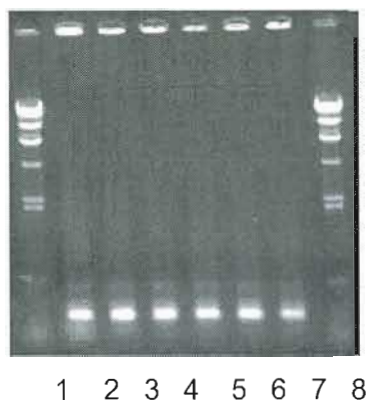


Figure 4.9 : Résultats du PCR (ayant migré sur gel d'agarose 0,8%) effectué avec une colonie pour chaque transformation afin de confirmer la présence de S5 dans chacun des six plasmides transformés. (1) et (8) Échelle de poids moléculaire obtenue par la digestion du phage lambda par l'enzyme *HindIII*. (2) PCR effectuée à partir d'une colonie transformée avec le clone d'expression pDEST17/S5 ; (3) à partir du clone pDEST-544/S5 ; (4) à partir du clone pDEST-545/S5 ; (5) à partir du clone pDEST-546/S5 ; (6) à partir du clone pDEST-566/S5 ; (7) à partir du clone pDEST-567/S5.

Après avoir obtenu la certitude que notre région d'ADN d'intérêt (S5) était bien présente dans chacun des clones d'expression, ces derniers furent isolés, purifiés puis quantifiés à environ 200 ng/μl tel que montré à la figure 4.10.

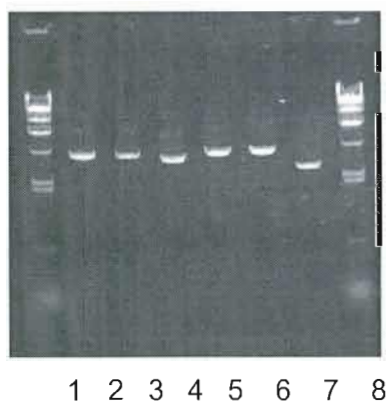


Figure 4.10 : Résultats de la migration de l'ADN des clones d'expression extraits et purifiés des bactéries *E. coli DH5α* (1) et (8) Échelle de poids moléculaire obtenue par la digestion du phage lambda par l'enzyme *HindIII*. (2) pDEST17/S5 ; (3) pDEST-544/S5 ; (4) pDEST-545/S5 ; (5) pDEST-546/S5 ; (6) pDEST-566/S5 ; (7) pDEST-567/S5.

Des bactéries *Rosetta* furent ensuite transformées avec chacun des plasmides présentés à la figure 4.10 et sélectionnées sur milieu contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol. Trois colonies de chacune des six nouvelles souches furent par la suite sélectionnées afin de vérifier l'efficacité de production des protéines recombinantes suivant quatre différents protocoles d'induction à l'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Les quatre protocoles testés sont les suivants :

Protocole 1 : Faire une pré-culture des bactéries pendant la nuit dans du milieu LB (*Lysogeny Broth*) contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol. Diluer ensuite la culture quatre fois avec du milieu TB (*Terrific Broth*) de façon à obtenir une densité optique entre 0,8 et 1,0 après 1-1,5 heures d'incubation à 37°C. Induire la culture avec une concentration finale de 1 mM IPTG pendant 3 heures. Centrifuger la culture à 3000 rpm pendant 20 minutes à 4°C et conserver le culot à -80°C.

Protocole 2 : Faire une pré-culture des bactéries pendant la nuit dans du milieu LB contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol. Diluer ensuite la culture quatre fois avec du milieu TB de façon à obtenir une densité optique entre 0,8 et 1,0 après 1-1,5 heures d'incubation à 37°C. Induire la culture avec une concentration finale de 1 mM IPTG pendant 5 heures. Centrifuger la culture à 3000 rpm pendant 20 minutes à 4°C et conserver le culot à -80°C.

Protocole 3 : Faire une pré-culture des bactéries pendant la nuit dans du milieu LB contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol. Diluer ensuite la culture sept fois avec du milieu TB de façon à obtenir une densité optique entre 0,8 et 1,0 après deux heures d'incubation à 37°C. Induire la culture avec une concentration finale de 1 mM IPTG pendant 5 heures. Centrifuger la culture à 3000 rpm pendant 20 minutes à 4°C et conserver le culot à -80°C.

Protocole 4 : Faire une pré-culture des bactéries pendant la nuit dans du milieu LB contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol. Diluer ensuite la culture sept fois

avec du milieu TB de façon à obtenir une densité optique entre 0,8 et 1,0 après 2 heures d'incubation à 37°C. Induire la culture avec une concentration finale de 1 mM IPTG pendant 3 heures. Centrifuger la culture à 3000 rpm pendant 20 minutes à 4°C et conserver le culot à -80°C.

La figure 4.11 présente les résultats du dot-blot obtenu pour chacune des trois colonies des six vecteurs testés avec les quatre protocoles. Le terme « dot-blot » regroupe un ensemble de techniques de transfert de molécules permettant de vérifier la présence de molécules spécifiques dans un milieu. Dans ce cas-ci, on cherche à vérifier la présence de notre protéine recombinante His-tag dans la bactérie. Pour ce faire, on transfère une petite quantité de culture bactérienne sur une membrane de nitrocellulose qu'on détecte avec un anticorps anti-His fluorescent. On expose finalement la membrane à un film photo-sensible puis on observe les résultats.

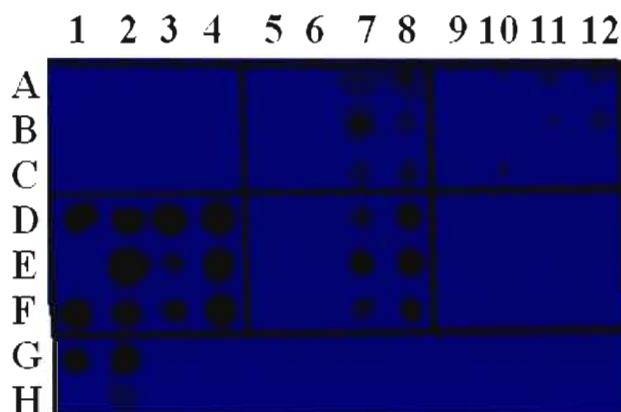


Figure 4.11 : Résultats du dot-blot obtenu pour chacune des trois colonies des six vecteurs testés avec les quatre protocoles (voir tableau 4.4 pour le contenu de chacun des puits).

Tableau 4.4 : Résultats du dot-blot permettant de vérifier l'expression de la protéine recombinante d'intérêt. Les chiffres de la première rangée du tableau correspondent aux numéros des protocoles testés (1, 2, 3 ou 4). Le chiffre entre parenthèses correspond au numéro de la colonie sélectionnée tandis que les chiffres devant la parenthèse correspondent aux vecteurs pDEST- testés (pDEST-17, pDEST-544, pDEST545, pDEST-546, pDEST-566 ou pDEST-567).

	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
A	17(1)	17(1)	17(1)	17(1)	544 (1)	544 (1)	544 (1)	544 (1)	545 (1)	545 (1)	545 (1)	545 (1)
B	17(2)	17(2)	17(2)	17(2)	544 (2)	544 (2)	544 (2)	545 (2)	545 (2)	545 (2)	545 (2)	545 (2)
C	17(3)	17(3)	17(3)	17(3)	544 (3)	544 (3)	544 (3)	544 (3)	545 (3)	545 (3)	545 (3)	545 (3)
D	546 (1)	546 (1)	546 (1)	546 (1)	566 (1)	566 (1)	566 (1)	566 (1)	567 (1)	567 (1)	567 (1)	567 (1)
E	546 (2)	546 (2)	546 (2)	546 (2)	566 (2)	566 (2)	566 (2)	566 (2)	567 (2)	567 (2)	567 (2)	567 (2)
F	546 (3)	546 (3)	546 (3)	546 (3)	566 (3)	566 (3)	566 (3)	566 (3)	567 (3)	567 (3)	567 (3)	567 (3)
G	Contr. 0,2µg											
H	Contr. 0,67µg											

Suite aux résultats d'expression de ce premier dot-blot, les colonies 1 et 2 du vecteur pDEST-546, la colonie 2 du vecteur pDEST-544 ainsi que la colonie 2 du vecteur pDEST-566 furent sélectionnées pour un deuxième dot-blot qui allait permettre de vérifier la solubilité de nos protéines recombinantes d'intérêt. Pour ce faire, une partie du lysat bactérien fut centrifugé puis le surnageant correspondant à la fraction soluble fut déposé sur une membrane de cellulose avant la détection à l'anticorps. Les résultats de ce second dot-blot sont présentés à la figure 4.12 avec le contenu de chacun des puits affichés dans le tableau 4.5.

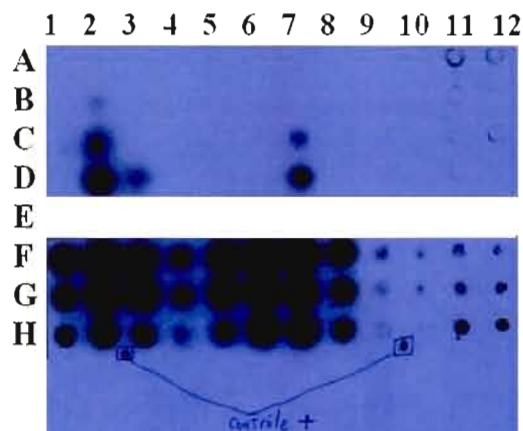


Figure 4.12 : Résultats du dot-blot #2 pour vérifier la solubilité de la protéine recombinante d'intérêt. Deux colonies avec le vecteur pDEST-546, une colonie avec le vecteur pDEST-544 et une colonie avec le vecteur pDEST-566 furent choisis en fonction des résultats du dot-blot précédent.

Tableau 4.5 : Résultats du dot-blot #2 obtenu pour chacun des puits. Les chiffres de la première rangée du tableau correspondent aux numéros des protocoles testés (1, 2, 3 ou 4). Le chiffre entre parenthèses correspond au numéro de la colonie sélectionnée (1 ou 2) tandis que les chiffres devant la parenthèse correspondent aux vecteurs pDEST retenus (pDEST-546, pDEST-544 ou pDEST-566).

	1	2	3	4	1	2	3	4	3	4	3	4
A	546 (1)	546 (1)	546 (1)	546 (1)	546 (2)	546 (2)	546 (2)	546 (2)	544 (2)	544 (2)	566 (2)	566 (2)
B	546 (1)	546 (1)	546 (1)	546 (1)	546 (2)	546 (2)	546 (2)	546 (2)	544 (2)	544 (2)	566 (2)	566 (2)
C	546 (1)	546 (1)	546 (1)	546 (1)	546 (2)	546 (2)	546 (2)	546 (2)	544 (2)	544 (2)	566 (2)	566 (2)
D	546 (1)	546 (1)	546 (1)	546 (1)	546 (2)	546 (2)	546 (2)	546 (2)	544 (2)	544 (2)	566 (2)	566 (2)
E												
F	546 (1)	546 (1)	546 (1)	546 (1)	546 (2)	546 (2)	546 (2)	546 (2)	544 (2)	544 (2)	566 (2)	566 (2)
G	546 (1)	546 (1)	546 (1)	546 (1)	546 (2)	546 (2)	546 (2)	546 (2)	544 (2)	544 (2)	566 (2)	566 (2)
H	546 (1)	546 (1)	546 (1)	546 (1)	546 (2)	546 (2)	546 (2)	546 (2)	544 (2)	544 (2)	566 (2)	566 (2)

Pour la rangée A, les bactéries entières furent déposées sur la membrane. Pour B, C et D, 20 µl de lysat total (non centrifugé) furent déposés sur la membrane tandis

que pour F, G et H, 20 μ l de lysat soluble (surnageant après centrifugation) furent déposés sur la membrane.

Suite aux résultats d'expression de ce second dot-blot, la colonie 2 de la souche contenant le vecteur pDEST-546 fut sélectionnée pour exprimer notre fragment protéique car elle surexprimait le mieux le peptide transmembranaire d'intérêt S5 sous une forme soluble. Cette solubilité est très probablement due à la présence de son partenaire de fusion, la protéine thiorédoxine (Trx – voir tableau 4.3). Le protocole 2 fut également sélectionné pour l'étape d'expression car il permettait une production maximale (voir dot-blot 1 et 2).

Pour la purification, le surnageant du lysat centrifugé fut exposé 30 minutes aux billes d'agarose couplées à des atomes de nickel dans un tube eppendorf™ avec une faible agitation (voir colonne 5 figure 4.13). Les billes furent ensuite nettoyées cinq fois avec dix volumes d'un tampon contenant 20 mM d'imidazole (voir colonne 6 figure 4.13).

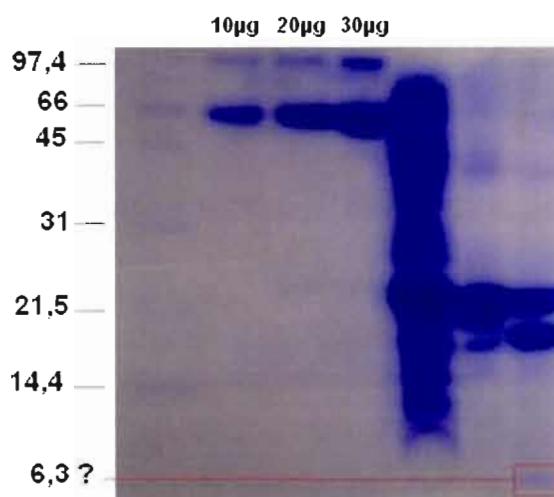


Figure 4.13 : Gel SDS-PAGE 19%. Colonne 1 = échelle de poids moléculaire; colonne 2 = BSA 10 μ g; colonne 3 = BSA 20 μ g; colonne 4 = BSA 30 μ g; colonne 5 = billes d'agarose bouillies après 30 minutes d'exposition au lysat bactérien; colonne 6 = billes d'agarose bouillies après 30 minutes d'exposition au lysat bactérien + 5 lavages pour éliminer les protéines non-spécifiques; colonne 7 = billes bouillies

après 30 minutes d'exposition au lysat bactérien + 5 lavages + digestion enzymatique avec Factor Xa.

Une fois les lavages complétés, le tampon de digestion (20mM Tris HCl + 100 mM NaCl + 2 mM CaCl_2 , pH8) fut ajouté au tube contenant les billes d'agarose avant d'ajouter l'enzyme Factor Xa pour le clivage ayant lieu durant la nuit à $\sim 23^\circ\text{C}$. Les résultats de la digestion enzymatique sont présentés à la dernière colonne de la figure 4.13.

3.4 Problèmes et solutions

Des problèmes sont survenus lors de l'étape de purification de la protéine. Tout d'abord, il a été très difficile d'identifier sur gel SDS-PAGE la bande de 6,3 kDa correspondant à notre fragment protéique d'intérêt clivé de son tag His6-Trx. En effet, sur plusieurs gels effectués, la bande n'apparaissait pas tout le temps ce qui est étrange considérant la digestion par Factor Xa ($\sim 50\%$) qui est clairement visible sur le gel (voir figure 4.13 colonne 7). De plus, il a été impossible d'identifier notre fragment d'intérêt par spectrométrie de masse lorsque ce dernier apparaissait sur le gel.

Des expériences avec une variété de détergents (DMPC, DHPC, C_6F_{13} et C_8F_{17} [126]) furent réalisées afin d'essayer de remédier au problème de précipitation/dégradation du fragment S5 résultant de la protéolyse. La stratégie espérée était que l'emploi de détergents allait stabiliser le fragment transmembranaire (hydrophobe) après la protéolyse et ainsi éviter qu'il ne s'agrège une fois dissocié de son tag. Trois concentrations (0,1%, 0,5%, 1%) différentes ont été testées pour chacun des détergents utilisés. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas permis de récupérer notre fragment d'intérêt. Les conclusions observées sont les suivantes : 1) L'utilisation des détergents ne permet pas un meilleur clivage enzymatique; 2) les concentrations de détergents supérieures à 0,5% nuisent grandement à la migration sur gel SDS-PAGE; 3) l'utilisation de 0,1% de DMPC

permet d'enlever pratiquement toutes les protéines non spécifiques des billes d'agarose tout en conservant la protéine d'intérêt sur les billes.

Des tests furent également effectués dans le but d'isoler le fragment d'intérêt après le clivage enzymatique. Tout d'abord, le surnageant après la digestion fut soumis à une centrifugation à haute vitesse sur une membrane de filtration ayant une limite de porosité de 10 kDa. La stratégie visait à faire passer le peptide hERG de 6,3 kDa au travers de la membrane tandis que l'enzyme digestive Factor Xa, le tag His6-Trx résultant de la digestion, de même que la protéine recombinante entière non clivée (tag His6-Trx + peptide hERG) devaient rester sur la membrane. Cependant, cette stratégie s'est avérée inefficace puisque le peptide hERG n'a jamais pu être identifié dans le filtrat après centrifugation (aucune bande observée sur les gels effectués). Le surnageant a même été mélangé avec de l'urée 8 M afin de bien dénaturer les protéines avant la centrifugation sur membrane de filtration et afin d'éliminer tout soupçon concernant l'agrégation potentielle du peptide hERG une fois séparé de son tag His6-Trx qui le rendait soluble. Cependant, même après ce traitement à l'urée, aucune bande de 6,3 kDa n'a jamais pu être identifiée.

Malgré les complications survenues, des expériences sont toujours en cours pour tenter de purifier le segment S5. Étant donné la présence de protéines d'intérêt dégradées sur plusieurs gels, des modifications au protocole d'expression seront apportées afin de diminuer le temps d'induction de la protéine et ainsi tenter de diminuer la quantité de protéines dégradées à l'intérieur de la bactérie. En effet, plusieurs bandes non identifiées de poids moléculaires différents furent observées à plusieurs reprises sur les gels SDS-PAGE. Trois de ces bandes furent envoyées à la spectrométrie de masse où il a été confirmé qu'il s'agissait de fragments provenant de la thiorédoxine. Cependant, aucun fragment correspondant à la séquence S5 du canal hERG n'a été identifié.

Finalement, les énergies sont actuellement focalisées dans la purification du segment S6 et du segment S5-S6. Des expériences sont en cours afin de

déterminer si ces segments peuvent être exprimés avec seulement un tag His6 qu'il n'est pas nécessaire de cliver avant de faire des analyses RMN. Ces segments transmembranaires non solubles seraient exprimés soit dans la membrane d'*E. coli* ou soit sous forme de corps d'inclusions à l'intérieur de la bactérie. Plusieurs protéines membranaires ont été purifiées à partir de la membrane ou des corps d'inclusions [123]. Ainsi, de nombreux protocoles sont disponibles et pourront être testés advenant la possibilité d'exprimer ces segments avec un tag His6 dans *E. coli*.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Grâce aux techniques de RMN de l'état liquide et de l'état solide, nous avons démontré que le segment extracellulaire Ile⁵⁸³–Tyr⁵⁹⁷ provenant du canal hERG interagit fortement avec une membrane modèle de PC sur laquelle il repose principalement au niveau de la région polaire. Tel que montré par les analyses de dichroïsme circulaire, ce segment n'adopte pas une structure secondaire bien définie malgré sa forte interaction avec cette membrane. Cependant, nous avons démontré que la conformation de ce segment varie en fonction de la nature et de la charge de la membrane modèle, ce qui prouve sa grande flexibilité structurale. Ces résultats suggèrent que la membrane joue un rôle important dans le fonctionnement du canal hERG, probablement en stabilisant des conformations transitoires durant les processus d'ouverture et de fermeture contrôlés par voltage. L'interaction du segment extracellulaire Ile⁵⁸³–Tyr⁵⁹⁷ avec quatre médicaments cardiotoxiques (bepridil, cetirizine, diphenhydramine et pentamidine) s'est avérée négligeable. Cependant, ces médicaments ont démontré une forte affinité pour la membrane, ouvrant ainsi la voie à un possible mécanisme du SQTl contrôlé par cette dernière ou à un mécanisme de catalyse membranaire.

Étant donné la forte interaction des médicaments avec la membrane modèle (Chapitre 3), il serait intéressant de réaliser des expériences de STD sur ces médicaments en présence des bicelles afin de déterminer leur localisation dans un environnement membranaire. Il aurait également été opportun d'effectuer des expériences STD sur tous les médicaments afin de vérifier toute interaction directe avec le segment hERG dans la membrane modèle et la possibilité d'affinités différentes en fonction de la structure des molécules.

Dans le futur, il faudrait poursuivre l'étude de l'interaction du segment extracellulaire Ile⁵⁸³–Tyr⁵⁹⁷ avec d'autres médicaments cardiotoxiques. En procédant à des mesures de diffusion par RMN de l'état liquide, on pourrait effectuer un criblage de plusieurs médicaments de structures et classes pharmacologiques

variées, et ainsi calculer leur pourcentage d'interaction avec notre segment extracellulaire. Les médicaments démontrant une interaction significative (par exemple supérieure à 25%) pourraient ensuite être utilisés pour des analyses plus poussées telles que STD.

Un autre élément intéressant serait de travailler avec un segment extracellulaire plus long. Il serait alors possible de faire de nouveaux tests d'interactions avec des médicaments cardiotoxiques, ou encore de vérifier si la longueur du segment influence sa capacité à se structurer, surtout dans des bicelles de PC. De plus, puisque certaines études ont démontré que le cholestérol et la sphingomyéline contrôlèrent le fonctionnement et la distribution de certains canaux potassiques dans la membrane de cardiomyocytes [102, 127, 128], il serait intéressant d'ajouter ces lipides à nos membranes modèles pour les analyses structurales et les études d'interactions ultérieures. Enfin, une étude rapide et peu coûteuse consisterait à procéder à des analyses structurales (en combinant la RMN et le dichroïsme circulaire) sur le segment extracellulaire Ile⁵⁸³–Tyr⁵⁹⁷ en présence de différentes concentrations de potassium afin d'observer les possibles changements conformationnels.

En ce qui concerne la purification du segment S5, des expériences sont toujours en cours et sont sur la bonne voie grâce aux progrès réalisés dans le cadre de ce projet. Étant donné la présence de protéines d'intérêt dégradées sur plusieurs gels, des modifications au protocole d'expression seront apportées afin de diminuer le temps d'induction de la protéine et ainsi tenter de réduire la quantité de protéines dégradées à l'intérieur de la bactérie. De plus, tel que mentionné à la fin du Chapitre 4, des expériences sont également en cours pour purifier le segment S6 et le segment S5-S6. On tente actuellement de déterminer si ces segments peuvent être exprimés avec seulement un His-tag soit dans la membrane d'*E. coli*, ou soit sous forme de corps d'inclusions à l'intérieur de la bactérie. En effet, de nombreux protocoles sont disponibles et pourront être testés advenant la possibilité d'exprimer ces segments avec seulement un His-tag dans *E. coli*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Boston Scientific, Long QT Syndrome, Spring 2005 Issue
- [2] R. Pearlstein, R. Vaz, D. Rampe, Understanding the structure-activity relationship of the human ether-a-gogo-related gene cardiac K⁺ channel. A model for bad behavior, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 2017-2022.
- [3] F. De Ponti, E. Poluzzi, N. Montanaro, Organising evidence on QT prolongation and occurrence of Torsades de Pointes with non-antiarrhythmic drugs: a call for consensus, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 57 (2001) 185-209.
- [4] F. De Ponti, E. Poluzzi, A. Cavalli, M. Recanatini, N. Montanaro, Safety of non-antiarrhythmic drugs that prolong the QT interval or induce torsade de pointes: an overview, *Drug Saf.* 25 (2002) 263-286.
- [5] A.M. Brown, D. Rampe, Drug-induced long QT syndrome: is HERG the root of all evil, *Pharmaceutical News* 7 (2000) 15-20.
- [6] GenScript, hERG Safety Testing Services, 2009.
- [7] R.R. Shah, Drug-induced QT interval prolongation - regulatory guidance and perspectives on hERG channel studies, in: D.J. Chadwick, J. Goode (Eds.), *The hERG cardiac potassium channel: structure, function and long QT syndrome*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2005, pp. 251-285.
- [8] M. Recanatini, E. Poluzzi, M. Masetti, A. Cavalli, F. De Ponti, QT prolongation through hERG K(+) channel blockade: current knowledge and strategies for the early prediction during drug development, *Med. Res. Rev.* 25 (2005) 133-166.
- [9] A.M. Aronov, Predictive *in silico* modeling for hERG channel blockers, *Drug Discov. Today* 10 (2005) 149-155.
- [10] E. Ficker, W. Jarolimek, J. Kiehn, A. Baumann, A.M. Brown, Molecular determinants of dofetilide block of HERG K⁺ channels, *Circ. Res.* 82 (1998) 386-395.
- [11] J.P. Lees-Miller, Y. Duan, G.Q. Teng, H.J. Duff, Molecular determinant of high-affinity dofetilide binding to HERG1 expressed in *Xenopus* oocytes: involvement of S6 sites, *Mol. Pharmacol.* 57 (2000) 367-374.
- [12] J.S. Mitcheson, J. Chen, M. Lin, C. Culberson, M.C. Sanguinetti, A structural basis for drug-induced long QT syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 12329-12333.
- [13] J. Mitcheson, The hERG cardiac potassium channel: structure, function and long QT syndrome, in: D.J. Chadwick, J. Goode (Eds.), *The hERG cardiac potassium channel: structure, function and long QT syndrome*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2005, pp. 136-170.
- [14] J. Liu, M. Jiang, G.-N. Tseng, Structural and functional role of the extracellular S5-P linker in the HERG potassium channel, *J. Gen. Physiol.* 120 (2002) 723-737.
- [15] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B.T. Chait, R. MacKinnon, Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel, *Nature* 417 (2002) 515-522.
- [16] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B.T. Chait, R. MacKinnon, X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel, *Nature* 423 (2003) 33-41.

- [17] A.J. Labro, A.L. Raes, I. Bellens, N. Ottschytsch, D.J. Snyders, Gating of shaker-type channels requires the flexibility of S6 caused by prolines, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 50724-50731.
- [18] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Partition coefficients and their uses, *Chemical Reviews* 71 (2002) 525-616.
- [19] J.D. Baleja, Structure determination of membrane-associated proteins from nuclear magnetic resonance data, *Anal. Biochem.* 288 (2001) 1-15.
- [20] C.R. Sanders, J.P. Schwonek, Characterization of magnetically orientable bilayers in mixtures of dihexanoyl-phosphatidylcholine and dimyristoyl-phosphatidylcholine by solid-state NMR, *Biochemistry* 31 (1992) 8898-8905.
- [21] I. Marcotte, M. Auger, Bicelles as model membranes for solid- and solution-state NMR studies of membrane peptides and proteins, *Concepts Magn. Res.* 24A (2005) 17-37.
- [22] R.R. Vold, R.S. Prosser, A.J. Deese, Isotropic solutions of phospholipid bicelles: a new membrane mimetic for high-resolution NMR studies of polypeptides, *J. Biomol. NMR* 9 (1997) 329-335.
- [23] I. Marcotte, Notes de cours CHI-7600, UQAM (2008).
- [24] D.F.R. Smadja, Biophysique, ESTEM, Paris, 1996.
- [25] T.C. Pochapsky, *NMR for Physical and Biological Scientists*, Jackie Harbor, New York, USA, 2007, 372 p.
- [26] R.S. Macomber, *A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy*, New York, 1997.
- [27] K. Röehm, *Atlas de Poche de Biochimie*, Paris, 2004.
- [28] J. Seelig, Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes, *Q. Rev. Biophys.* 10 (1977) 353-418.
- [29] S.J. Opella, F.M. Marassi, Structure determination of membrane proteins by NMR spectroscopy, *Chem. Rev.* 104 (2004) 3587-3606.
- [30] M. Salzmann, K. Pervushin, G. Wider, H. Senn, K. Wuthrich, NMR Assignment and Secondary Structure Determination of an Octameric 110 kDa Protein Using TROSY in Triple Resonance Experiments, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 7543-7548.
- [31] L. Braunschweiler, R.R. Ernst, Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy, *Journal of Magnetic Resonance* 53 (1983) 521-528.
- [32] S.B. Stefan Berger, *200 and More NMR Experiments*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004, 838 p.
- [33] W. Braun, C. Bosch, L.R. Brown, N. Go, K. Wuthrich, Combined use of proton-proton Overhauser enhancements and a distance geometry algorithm for determination of polypeptide conformations. Application to micelle-bound glucagon, *Biochim. Biophys. Acta* 667 (1981) 377-396.
- [34] E.O. Stejskal, J.E. Tanner, Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient, *The Journal of Chemical Physics* 42 (1965) 288-292.
- [35] M. Mayer, B. Meyer, Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.* 38 (1999) 1784-1788.

- [36] M. Mayer, B. Meyer, Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 6108-6117.
- [37] J. Wang, J.R. Schnell, J.J. Chou, Amantadine partition and localization in phospholipid membrane: a solution NMR study, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 324 (2004) 212-217.
- [38] G. Cevc, *Phospholipids Handbook*, Marcel Dekker Inc, New York, 1993, 988p.
- [39] J. Seelig, ^{31}P nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 515 (1978) 105-140.
- [40] I. Marcotte, 2009.
- [41] L. Whitmore, B.A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers* 89 (2008) 392-400.
- [42] S.M. Kelly, T.J. Jess, N.C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochimica et Biophysica Acta* 1751 (2005) 119-139.
- [43] N.J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 2876-2890.
- [44] M.C. Trudeau, J.W. Warmke, B. Ganetzky, G.A. Robertson, HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family, *Science* 269 (1995) 92-95.
- [45] R. MacKinnon, Pore loops: an emerging theme in ion channel structure, *Neuron* 14 (1995) 889-892.
- [46] D.M. Roden, R. Temple, The US Food and Drug Administration Cardiorenal Advisory Panel and the Drug Approval Process, *Circulation* 111 (2005) 1697-1702.
- [47] M.C. Sanguinetti, M. Tristani-Firouzi, hERG potassium channels and cardiac arrhythmia, *Nature* 440 (2006) 463-469.
- [48] H. Abriel, J. Schl pfer, D.I. Keller, B. Gavillet, J. Biollaz, R. Stoller, L. Kappenberger, Molecular and clinical determinants of drug-induced long QT syndrome an iatrogenic channelopathy, *Swiss Med. Wkly* 134 (2004) 685-694.
- [49] S. Ekins, Predicting undesirable drug interactions with promiscuous proteins *in silico*, *Drug Discov. Today* 9 (2004) 276-285.
- [50] K. Kamiya, J.S. Mitcheson, K. Yasui, I. Kodama, M.C. Sanguinetti, Open channel block of HERG K^+ channels by vesnarinone, *Mol. Pharmacol.* 60 (2001) 244-253.
- [51] J.A. Sanchez-Chapula, T. Ferrer, R.A. Navarro-Polanco, M.C. Sanguinetti, Voltage-dependent profile of human ether-a-go-go-related gene channel block is influenced by a single residue in the S6 transmembrane domain, *Mol. Pharmacol.* 63 (2003) 1051-1058.
- [52] J.A. Sanchez-Chapula, R.A. Navarro-Polanco, C. Culberson, J. Chen, M.C. Sanguinetti, Molecular determinants of voltage-dependent human ether-a-go-go related gene (HERG) K^+ channel block, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 23587-23595.

- [53] M.C. Sanguinetti, J. Chen, D. Fernandez, K. Kamiya, J. Mitcheson, J.A. Sanchez-Chapula, Physicochemical basis for binding and voltage-dependent block of hERG channels by structurally diverse drugs, *The hERG cardiac potassium channel: structure, function and long QT syndrome*, vol. 266, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2005, pp. 159-170.
- [54] G.B. Gurrola, B. Rosati, M. Rocchetti, G. Pimienta, A. Zaza, A. Arcangeli, M. Olivotto, L.D. Possani, E. Wanke, A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K⁺ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom, *FASEB J.* 13 (1999) 953-962.
- [55] Y.V. Korolkova, S.A. Kozlov, A.V. Lipkin, K.A. Pluzhnikov, J.K. Hadley, A.K. Filippov, D.A. Brown, K. Angelo, D. Strobaek, T. Jespersen, S.P. Olesen, B.S. Jensen, E.V. Grishin, An ERG channel inhibitor from the scorpion *Buthus eupeus*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 9868-9876.
- [56] L. Pardo-Lopez, M. Zhang, J. Liu, M. Jiang, L.D. Possani, G.-N. Tseng, Mapping the binding site of a human *ether-a-gogo*-related gene-specific peptide toxin (ErgTx) to the channel's outer vestibule, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 16403-16411.
- [57] M. Jiang, M. Zhang, I.V. Maslennikov, J. Liu, D.-M. Wu, Y.V. Korolkova, A.S. Arseniev, E.V. Grishin, G.-N. Tseng, Dynamic conformational changes of extracellular S5-P linkers in the hERG channel, *J. Physiol.* 569 (2005) 75-89.
- [58] M. Zhang, J. Liu, G.-N. Tseng, Gating charges in the activation and inactivation processes of the hERG channel, *J. Gen. Physiol.* 124 (2004) 703-718.
- [59] A.M. Torres, P. Bansal, M. Sunde, C.E. Clarke, J.A. Bursill, D.J. Smith, A. Bauskin, S.N. Breit, T.J. Campbell, P.F. Alewood, P.W. Kuchel, J.I. Vandenberg, Structure of the HERG K⁺ channel S5P extracellular linker, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 42136-42148.
- [60] M.N. Triba, D.E. Warschawski, P.F. Devaux, Reinvestigation by phosphorus NMR of lipid distribution in bicelles, *Biophys. J.* 88 (2005) 1887-1901.
- [61] P. Coumel, Safety of bepridil: from review of the European data, *Am. J. Cardiol.* 69 (1992) 75D-78D.
- [62] A. Gill, S.F. Flaim, B.P. Damiano, S.P. Sit, M.D. Brannan, Pharmacology of bepridil, *Am. J. Cardiol.* 69 (1992) 11D-16D.
- [63] C. Chouabe, M.D. Drici, G. Romey, J. Barhanin, Effects of calcium channel blockers on cloned cardiac K⁺ channels IKr and IKs, *Therapie* 55 (2000) 195-202.
- [64] H. Choe, K.H. Nah, S.N. Lee, H.S. Lee, H.S. Lee, S.H. Jo, C.H. Leem, Y.J. Jang, A novel hypothesis for the binding mode of HERG channel blockers, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 344 (2006) 72-78.
- [65] J.D. Gilbert, S.A. Cahill, D.G. McCartney, A. Lukas, G.J. Gross, Predictors of torsades de pointes in rabbit ventricles perfused with sedating and nonsedating histamine H1-receptor antagonists, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 78 (2000) 407-414.
- [66] W. Zareba, A.J. Moss, S.Z. Rosero, R. Hajj-Ali, J. Konecki, M. Andrews, Electrocardiographic findings in patients with diphenhydramine overdose, *Am. J. Cardiol.* 80 (1997) 1168-1173.

- [67] J.M. Wharton, P.A. Demopoulos, N. Goldschlager, Torsade de pointes during administration of pentamidine isethionate, *Am. J. Med.* 83 (1987) 571-576.
- [68] M. Pujol, J. Carratala, J. Mauri, P.F. Viladrich, Ventricular tachycardia due to pentamidine isethionate, *Am. J. Med.* 84 (1988) 980.
- [69] Y.A. Kuryshv, E. Ficker, L. Wang, P. Hawryluk, A.T. Dennis, B.A. Wible, A.M. Brown, J. Kang, X.-L. Chen, K. Sawamura, W. Reynolds, D. Rampe, Pentamidine-induced long QT syndrome and block of hERG trafficking, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312 (2005) 316-323.
- [70] D. Marsh, *CRC Handbook of lipid bilayers*, CRC Press Inc., Boca Raton, 1990.
- [71] D. Schwarz, F. Junge, F. Durst, N. Frolich, B. Schneider, S. Reckel, S. Sobhanifar, V. Dotsch, F. Bernhard, Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems, *Nat. Protocols* 2 (2007) 2945-2957.
- [72] R.R. Vold, R.S. Prosser, Magnetically oriented phospholipid bilayered micelles for structural studies of polypeptides. Does the ideal bicelle exist?, *J. Magn. Reson.* 113 (1996) 267-271.
- [73] A.S. Altieri, D.P. Hinton, R.A. Byrd, Association of biomolecular systems via pulsed field gradient NMR self-diffusion measurements, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 7566-7567.
- [74] M. Holz, Temperature-dependent self-diffusion coefficients of water and six selected molecular liquids for calibration in accurate ^1H NMR PFG measurements, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2 (2000) 4740-4742.
- [75] A. Bax, D.G. Davis, MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 65 (1985) 355-360.
- [76] J. Jeener, B.M. Meier, P. Bachmann, R.R. Ernst, Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy, *J. Chem. Phys.* 71 (1979) 4546-4553.
- [77] S. Macura, R.R. Ernst, Elucidation of cross relaxation in liquids by two-dimensional NMR spectroscopy, *Mol. Phys.* 41 (1980) 95-117.
- [78] M. Rance, R.A. Byrd, Obtaining high-fidelity spin-1/2 powder spectra in anisotropic media: phase-cycled Hahn echo spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 52 (1983) 221-240.
- [79] J.H. Davis, K.R. Jeffrey, M. Bloom, M.I. Valic, T.P. Higgs, Quadrupolar echo deuterium magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains, *Chem. Phys. Lett.* 42 (1976) 390-394.
- [80] J.D. van Beek, matNMR: A flexible toolbox for processing, analyzing and visualizing magnetic resonance data in Matlab®, *J. Magn. Reson.* 187 (2007) 19-26.
- [81] F. Delaglio, S. Grzesiek, G.W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J. Biomol. NMR* 6 (1995) 277-293.
- [82] B.A. Johnson, R.A. Blevins, NMRView: a computer program for the visualization and analysis of NMR data, *J. Biomol. NMR* 4 (1994) 603-614.

- [83] L. Whitmore, B.A. Wallace, DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) W668-673.
- [84] X. Gao, T.C. Wong, Studies of the binding and structure of adrenocorticotropin peptides in membrane mimics by NMR spectroscopy and pulsed-field gradient diffusion, *Biophys. J.* 74 (1998) 1871-1888.
- [85] I. Marcotte, F. Separovic, M. Auger, S.M. Gagné, A multidimensional ^1H NMR investigation of the conformation of methionine-enkephalin in fast-tumbling bicelles, *Biophys. J.* 86 (2004) 1587-1600.
- [86] T.L. Whitehead, L.M. Jones, R.P. Hicks, Effects of the incorporation of CHAPS into SDS micelles on neuropeptide-micelle binding: separation of the role of electrostatic interactions from hydrophobic interactions, *Biopolymers* 58 (2001) 593-605.
- [87] S. Gaemers, A. Bax, Morphology of three lyotropic liquid crystalline biological NMR media studied by translational diffusion anisotropy, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 12343-12352.
- [88] P.A. Luchette, T.N. Vetman, R.S. Prosser, R.E.W. Hancock, M.-P. Nieh, C.J. Glinka, S. Krueger, J. Katsaras, Morphology of fast-tumbling bicelles: a small angle neutron scattering and NMR study, *Biochim. Biophys. Acta* 1513 (2001) 83-94.
- [89] H. Johannesson, B. Halle, Solvent diffusion in ordered macrofluids: A stochastic simulation study of the obstruction effect, *J. Chem. Phys.* 104 (1996) 6807-6817.
- [90] A. Andersson, L. Mäler, Size and shape of fast-tumbling bicelles as determined by translational diffusion, *Langmuir* 22 (2006) 2447-2449.
- [91] P. Stilbs, Fourier transform pulsed-gradient spin-echo studies of molecular diffusion, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 19 (1987) 1-45.
- [92] A. Chen, M. Shapiro, Nuclear Overhauser effect on diffusion measurements, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 5338-5339.
- [93] L.H. Lucas, J. Yan, C.K. Larive, E.R. Zartler, M.J. Shapiro, Transferred nuclear overhauser effect in nuclear magnetic resonance diffusion measurements of ligand-protein binding, *Anal. Chem.* 75 (2003) 627-634.
- [94] J.H. Davis, The description of membrane lipid concentration, order and dynamics by ^2H -NMR, *Biochim. Biophys. Acta* 737 (1983) 117-171.
- [95] F. Picard, M.-J. Paquet, J. Levesque, A. Bélanger, M. Auger, ^{31}P NMR first spectral moment study of the partial magnetic orientation of phospholipid membranes, *Biophys. J.* 77 (1999) 888-902.
- [96] E. Sternin, D. Nizza, K. Gawrish, Temperature dependence of DMPC/DHPC mixing in a bicellar solution and its structural implications, *Langmuir* 17 (2001) 2610-2616.
- [97] M.P. Nieh, C.J. Glinka, S. Krueger, R.S. Prosser, J. Katsaras, SANS study on the effect of lanthanide ions and charged lipids on the morphology of phospholipid mixtures. Small-angle neutron scattering, *Biophys. J.* 82 (2002) 2487-2498.

- [98] A. Arnold, T. Labrot, R. Oda, E.J. Dufourc, Cation modulation of "bicelle" size and magnetic alignment as revealed by solid state NMR and electron microscopy, *Biophys. J.* 82 (2002) 2667-2680.
- [99] J. Lind, A. Graslund, L. Maler, Membrane interactions of dynorphins, *Biochemistry* 45 (2006) 15931-15940.
- [100] C.R. Sanders, F. Sönnichsen, Solution NMR of membrane proteins: practice and challenges, *Magn. Reson. Chem.* 44 (2006) S24-S40.
- [101] B.W. Chellgren, A.-F. Miller, T.P. Creamer, Evidence for Polyproline II Helical Structure in Short Polyglutamine Tracts, *J. Mol. Biol.* 361 (2006) 362-371.
- [102] J. Abi-Char, A. Maguy, A. Coulombe, E. Balse, P. Ratajczak, J.-L. Samuel, S. Nattel, S.N. Hatem, Membrane cholesterol modulates Kv1.5 potassium channel distribution and function in rat cardiomyocytes, *J. Physiol.* 582 (2007) 1205-1217.
- [103] L.M. Boland, Drzweiecki, Polyunsaturated fatty acid modulation of voltage-gated ion channels, *Cell Biochem. Biophys.* 52 (2008) 59-84.
- [104] D.S. Wishart, B.D. Sykes, F.M. Richards, The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy, *Biochemistry* 31 (1992) 1647-1651.
- [105] G. Bazzoni, M. Rasia, Effects of amphipathic drug on the rheological properties of the cell membrane, *Blood Cells* 24 (1998) 552-559.
- [106] I. Marcotte, E.J. Dufourc, M. Ouellet, M. Auger, Interaction of the neuropeptide met-enkephalin with zwitterionic and negatively charged bicelles as viewed by ^{31}P and ^2H solid-state NMR, *Biophys. J.* 85 (2003) 328-339.
- [107] J. Wang, M.C. Trudeau, A.M. Zappia, G.A. Robertson, Regulation of deactivation by an amino terminal domain in *human ether-à-go-go-related gene* potassium channels, *J. Gen. Physiol.* 112 (1998) 637-647.
- [108] J. Wang, C.D. Myers, G.A. Robertson, Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K^+ channels, *J. Gen. Physiol.* 115 (2000) 749-758.
- [109] E.C. Roti Roti, C.D. Myers, R.A. Ayers, D.E. Boatman, S.A. Delfosse, E.K.L. Chan, M.J. Ackerman, C.T. January, G.A. Robertson, Interaction with GM130 during HERG ion channel trafficking, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 47779-47785.
- [110] G.-N. Tseng, K.D. Sonawane, Y.V. Korolkova, M. Zhang, J. Liu, E.V. Grishin, H.R. Guy, Probing the outer mouth structure of the hERG channel with peptide toxin footprinting and molecular modeling, *Biophys. J.* 92 (2007) 3524-3540.
- [111] P. Ju, G. Pages, R.P. Riek, P.-C. Chen, A.M. Torres, P. Bansal, S. Kuyucak, P.W. Kuchel, J.I. Vandenberg, The pore domain outer helix contributes to both activation and inactivation of the hERG K^+ channel, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 1000-1008.
- [112] J.A. Lundbaek, P. Birn, J. Girshman, A.J. Hansen, O.S. Andersen, Membrane stiffness and channel function, *Biochemistry* 35 (1996) 3825-3830.
- [113] A.G. Lee, Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective, *Biochim. Biophys. Acta* 1612 (2003) 1-40.

- [114] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9 (2008) 112-124.
- [115] R.D. Krueger-Koplin, P.L. Sorgen, S.T. Krüeger-Koplin, I.O. Rivera-Torres, S.M. Cahill, D.B. Hicks, L. Grinius, T.A. Krulwich, M.E. Girvin, An evaluation of detergents for NMR structural studies of membrane proteins, *J. Biomol. NMR* 17 (2004) 43-57.
- [116] E. Perozo, A. Kloda, D.M. Cortes, B. Martinac, Physical principles underlying the transduction of the bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating, *Nat. Struct. Biol.* 9 (2002) 696-703.
- [117] O.G. Mouritsen, K. Jorgensen, A new look at lipid-membrane structure in relation to drug research, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1507-1519.
- [118] D. Schmidt, R. MacKinnon, Voltage-dependent K⁺ channel gating and voltage sensor toxin sensitivity depend on the mechanical state of the lipid membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 19276-19281.
- [119] J.E. Baenziger, S.E. Ryan, M.M. Goodried, V. N.Q., R.M. Sturgeon, C.J.B. daCosta, Lipid composition alters drug action at the nicotinic acetylcholine receptor, *Mol. Pharmacol.* 73 (2008) 880-890.
- [120] D.F. Sargent, R. Schwyzer, Membrane lipid phase as catalyst for peptide-receptor interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 5774-5778.
- [121] J.G. Marblestone, S.C. Edavettal, Y. Lim, P. Lim, X. Zuo, T.R. Butt, Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO, *Protein Sci.* 15 (2006) 182-189.
- [122] S. Sobhanifar, S. Reckel, F. Junge, D. Schwarz, L. Kai, M. Karbyshev, F. Lohr, F. Bernhard, V. Dotsch, Cell-free expression and stable isotope labelling strategies for membrane proteins, *J. Biomol. NMR* (2009).
- [123] R.C. Page, J.D. Moore, H.B. Nguyen, M. Sharma, R. Chase, F.P. Gao, C.K. Mobley, C.R. Sanders, L. Ma, F.D. Sonnichsen, S. Lee, S.C. Howell, S.J. Opella, T.A. Cross, Comprehensive evaluation of solution nuclear magnetic resonance spectroscopy sample preparation for helical integral membrane proteins, *J. Struct. Funct. Genomics* 7 (2006) 51-64.
- [124] D. Sachdev, J.M. Chirgwin, Solubility of Proteins Isolated from Inclusion Bodies Is Enhanced by Fusion to Maltose-Binding Protein or Thioredoxin, *Protein Expression and Purification* 12 (1998) 122-132.
- [125] J. Hartman, P. Daram, R.A. Frizzell, T. Rado, D.J. Benos, E.J. Sorscher, Affinity purification of insoluble recombinant fusion proteins containing glutathione-S-transferase, *Biotechnology and Bioengineering* 39 (1992) 828-832.
- [126] M.V. Rodnin, Y.O. Posokhov, C. Contino-Pépin, J. Brettmann, A. Kyrchenko, S.S. Palchevskyy, B. Pucci, A.S. Ladokhin, Interactions of Fluorinated Surfactants with Diphtheria Toxin T-Domain: Testing New Media for Studies of Membrane Proteins, 94 (2008) 4348-4357.
- [127] L.M. Boland, M.M. Drzewiecki, Polyunsaturated fatty acid modulation of voltage-gated ion channels, *Cell Biochem. Biophys.* 52 (2008) 59-84.
- [128] Y. Ramu, Y. Xu, Z. Lu, Enzymatic activation of voltage-gated potassium channels, *Nature* 442 (2006) 696-699.